

**DOTTORATO DI RICERCA IN ENTOMOLOGIA AGRARIA**  
**XXV CICLO**

Settore concorsuale 07/D1  
Settore Scientifico Disciplinare AGR/11

**RICERCHE DI CAMPO PER LO SVILUPPO DELLA**  
**TECNOLOGIA DEL MASCHIO STERILE NELLA LOTTA AD**  
***AEDES ALBOPICTUS* (SKUSE)**

**Presentata da: Dott. ssa Anna Medici**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. ssa Maria Luisa Dindo**

**Relatore**

**Prof. Stefano Maini**

***a Giada***

*Se pensi di essere troppo piccolo  
per fare la differenza  
prova a dormire con una  
zanzara*

***Dalai Lama***

## Ringraziamenti

Desidero ringraziare innanzitutto il Dr. Romeo Bellini che, sin dai tempi della laurea, è stato per me un riferimento fondamentale. Grazie per avermi dato la possibilità di raggiungere questo risultato.

Ringrazio inoltre il Prof. Maini, per aver accettato l'incarico di relatore della mia tesi e la Prof.ssa Maria Luisa Dindo, per la sua costante disponibilità.

Ringrazio il Dr. Candini e la sua equipe del Centro di Fisica Sanitaria dell'Ospedale S. Anna di Ferrara per la preziosa collaborazione nella fase di irraggiamento delle pupe.

Ringrazio anche tutti i colleghi del Centro Agricoltura Ambiente, di ENEA, dell'Università La Sapienza e del DiPSA di Bologna che hanno collaborato a questo progetto e con i quali ho condiviso tanti anni di lavoro.

Infine, grazie a chi mi è stato vicino con affetto sincero, condividendo le tappe di questa strada e comprendendo il grande valore che ha avuto per me il raggiungimento di questo traguardo.

# INDICE

|   |         |
|---|---------|
| 1. Introduzione   | pag. 6  |
| 1.1 Scopo della ricerca   | pag. 6  |
| 1.2 Cenni di biologia ed ecologia di <i>Aedes albopictus</i>                                      | pag. 10 |
| 1.3 Sorveglianza e strategie di lotta attualmente in uso  | pag. 13 |
| 1.3.1 Monitoraggio con ovitrappole  | pag. 13 |
| 1.3.2 Lotta antilarvale   | pag. 13 |
| 1.3.3 Azione larvicida del rame   | pag. 14 |
| 1.3.4 Trattamenti adulticidi  | pag. 14 |
| 1.3.5 Metodi di lotta genetici  | pag. 15 |
| 1.4 Tecnica dell'insetto sterile  | pag. 15 |
| 1.4.1 SIT su altri insetti  | pag. 17 |
| 1.4.2 SIT su zanzare  | pag. 20 |
| 1.4.3 SIT su <i>Aedes albopictus</i> in Italia  | pag. 25 |
| 2. Materiali e metodi   | pag. 27 |
| 2.1 Prima prova di dispersione  | pag. 27 |
| 2.2 Prove di alimentazione maschi   | pag. 31 |
| 2.2.1 Valutazione dell'effetto della somministrazione di sostanze<br>zuccherine in allevamento    | pag. 33 |
| 2.2.2 Prova di laboratorio 1 - Impiego di spugne con zucchero                                     | pag. 33 |
| 2.2.3 Prova di laboratorio 2 - Densità di pupe  | pag. 34 |
| 2.2.4 Prova di laboratorio 3 – Tipo di spugna   | pag. 35 |
| 2.2.5 Prova di laboratorio 4 – Tempi di alimentazione dei maschi<br>dopo lo sfarfallamento        | pag. 35 |
| 2.2.6 Prova di laboratorio 5 - Efficacia delle spugne nell'alimentazione<br>energetica dei maschi | pag. 36 |
| 2.2.7 Studio di semicampo in gabbie   | pag. 37 |
| 2.2.8 Studio di campo 1   | pag. 38 |

|   |         |
|---|---------|
| 2.2.9 Studio di campo 2   | pag. 40 |
| 2.2.10 Studio di semicampo in tunnel  | pag. 41 |
| 2.3 Seconda prova di dispersione  | pag. 43 |
| 2.4 Prove di affinamento della metodica per la valutazione della<br>competitività in fase di accoppiamento dei maschi in tunnel | pag. 45 |
| 3. Risultati  | pag. 49 |
| 3.1 Prima prova di dispersione  | pag. 49 |
| 3.2 Prove di alimentazione maschi   | pag. 52 |
| 3.2.1 Valutazione dell'effetto della somministrazione di sostanze<br>zuccherine in allevamento                                  | pag. 52 |
| 3.2.2 Prova di laboratorio 1 - Impiego di spugne con zucchero   | pag. 54 |
| 3.2.3 Prova di laboratorio 2 - Densità di pupe  | pag. 55 |
| 3.2.4 Prova di laboratorio 3 – Tipo di spugna   | pag. 55 |
| 3.2.5 Prova di laboratorio 4 – Tempi di alimentazione dei maschi<br>dopo lo sfarfallamento                                      | pag. 56 |
| 3.2.6 Prova di laboratorio 5 - Efficacia delle spugne nell'alimentazione<br>energetica dei maschi                               | pag. 56 |
| 3.2.7 Studio di semicampo in gabbie   | pag. 57 |
| 3.2.8 Studio di campo 1   | pag. 58 |
| 3.2.9 Studio di campo 2   | pag. 59 |
| 3.2.10 Studio di semicampo in tunnel  | pag. 63 |
| 3.3 Seconda prova di dispersione  | pag. 65 |
| 3.4 Prove di affinamento della metodica per la valutazione della<br>competitività in fase di accoppiamento dei maschi in tunnel | pag. 67 |
| 4. Discussione e conclusioni  | pag. 72 |
| 5. Bibliografia   | pag. 75 |

# 1. Introduzione

## 1.1 Scopo della ricerca

*Aedes albopictus*, comunemente detta Zanzara Tigre, si è diffusa, negli ultimi anni, in diversi paesi principalmente in modo passivo, attraverso il commercio dei pneumatici usati (Reiter e Sprenger, 1987). In Europa la specie è arrivata inizialmente in Albania alla fine degli anni '70 (Valzeille Falcoz, 1999), poi in Italia nel 1990 (Dalla Pozza et al., 1994; Sabbatini et al., 1990), in Francia nel 1999 (Schaffner and Karch, 1999), in Belgio nel 2000 (Schaffner et al., 2004), nel Montenegro nel 2001 (Petric et al., 2003), in Svizzera nel 2003 (Flacio et al., 2004), in Spagna e Croazia nel 2004, in Grecia nel 2005 (Benedict et al., 2007). Altri paesi sono già stati colonizzati o sono in via di colonizzazione in Medio Oriente, Africa e America (Fig. 1.1).

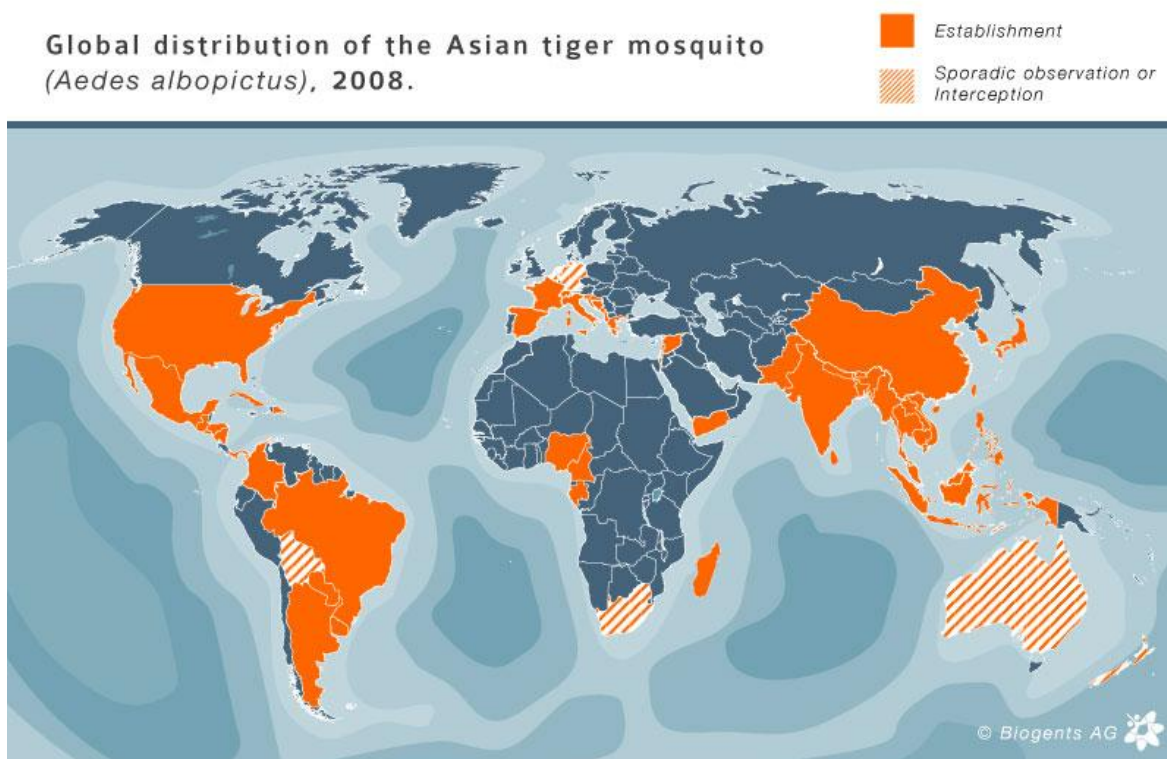


Fig. 1.1 - Distribuzione di *Aedes albopictus* nel mondo

In Italia il processo di colonizzazione è stato molto veloce, dovuto principalmente al trasporto passivo degli adulti all'interno degli autoveicoli. La specie è stata individuata nella maggior parte delle regioni italiane, incluse le grandi isole (Fig. 1.2). Si è ben adattata a superare gli inverni dei climi temperati ed è in grado di raggiungere elevate densità di popolazione nei mesi tardo estivi.

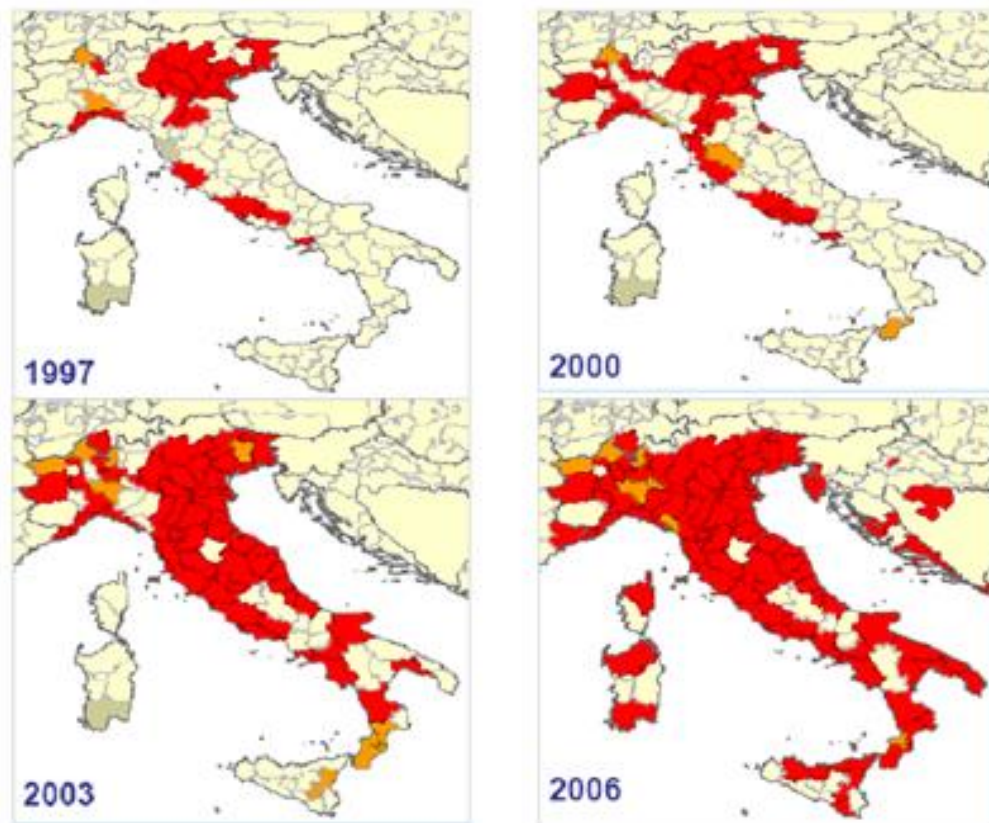


Fig. 1.2 - Diffusione di *Aedes albopictus* in Italia from Schaffner et al. (2007)

Oltre all'elevata aggressività nei confronti dell'uomo, che incide sulla qualità di vita dei cittadini nelle zone infestate, è nota la sua capacità vettoriale per la trasmissione di filaria (*Dirofilaria immitis* Leidy and *D. repens* Railliet and Henry) (Cancrini et al., 1992, Mitchell, 1995) e per numerosi arbovirus (Shroyer, 1986).

In Europa, si è verificata un'epidemia di *Chikungunya* in Emilia Romagna nel 2007 (Urbanelli et al., 2007) con 217 casi confermati prevalentemente nelle aree di Ravenna e Cesena e sono recentemente stati segnalati due focolai autoctoni di *Dengue* in Francia e Croazia nel 2010. Sono inoltre numerose le segnalazioni, ogni anno, di casi importati di febbri *Chikungunya* e *Dengue*.

L'epidemia di febbre da virus *Chikungunya* che si è verificata in Romagna ha dimostrato la possibilità di importazione di malattie trasmesse da vettori che fino ad ora si erano manifestate solo in zone tropicali.

In particolare, nelle zone tropicali dell'Asia, la zanzara tigre è vettore di diverse malattie virali causate da arbovirus, tra cui la *Dengue*, la febbre gialla e alcune encefaliti. Nel bacino del Mediterraneo, oltre a quello della *Chikungunya* sono 6 gli arbovirus attivi che potrebbero essere trasmessi dalla zanzara tigre, tra questi il *West Nile virus* e il virus della meningoencefalite dei tacchini, alcuni virus della famiglia dei *Togaviridae* e altri della famiglia dei *Bunyaviridae*.

Uno dei danni maggiori associati alla zanzara tigre, in ogni caso, è il suo impatto sulle abitudini di vita della popolazione. Si tratta infatti di un insetto molto aggressivo, che punge soprattutto nelle ore più fresche della giornata, al mattino presto e al tramonto. Le sue punture procurano gonfiori e irritazioni persistenti, pruriginosi o emorragici, e spesso anche dolorosi.

Nelle persone particolarmente sensibili, un elevato numero di punture può dare luogo a risposte allergiche che richiedono attenzione medica. La sua presenza in numerosi focolai può arrivare quindi a modificare le abitudini delle persone rendendo difficile la vita all'aperto nelle ore fresche della giornata, proprio quelle più piacevoli durante la stagione calda.

Nel nostro Paese, come nella maggior parte dei Paesi infestati da *Ae. albopictus*, i metodi di lotta (interventi larvicidi, rimozione dei focolai larvali, campagne di informazione) utilizzati per contrastarla, non sono in grado di fornire risultati soddisfacenti e di mantenere la popolazione al di sotto della soglia di tolleranza (Carrieri et al., 2008). La difficoltà principale che le pratiche di lotta convenzionali incontrano è legata alla specifica biologia di questa zanzara che trova nelle aree private innumerevoli luoghi di sviluppo larvale difficilmente gestibili e controllabili sia dall'ente pubblico (per ragioni economiche) che dal privato cittadino (per difetto di attenzione). Le campagne di informazione e sensibilizzazione dei cittadini danno in generale risultati insufficienti in termini di adesione attiva. Nello stesso tempo si sta assistendo al ricorso, sempre più frequente, di irrorazione di sostanze insetticide ad azione adulticida, con inevitabili effetti sanitari e ambientali correlati alla tossicità delle sostanze impiegate. A questo si deve



aggiungere la concreta possibilità di insorgenza di fenomeni di resistenza alle molecole larvicide e adulticide utilizzate (Sharma, 1985; Carter, 1989).

Vi è quindi la necessità di sviluppare nuove misure di contenimento che si dimostrino più efficaci di quelle convenzionali con l'obiettivo non di eradicare la specie dal territorio ma di sopprimerne la densità di popolazione entro livelli di sicurezza.

*Ae. albopictus* si presta particolarmente ad applicazioni col metodo dell'insetto sterile (SIT= Sterile Insect Technique) in considerazione della scarsa variabilità genetica (Urbanelli et al., 2000), della colonizzazione centrata sulle zone urbane, della scarsa tendenza alla dispersione attiva (Hawley, 1988), della forte mortalità naturale che si ha nel periodo invernale, della facilità di allevamento. Si tratta inoltre di una metodica priva di effetti secondari in quanto i maschi, ottenuti in allevamento e sessati tramite setacciamento (Medici et al., 2000), sono soggetti a mortalità naturale ed essendo sterili non introducono caratteri genetici esogeni nelle popolazioni naturali.

Dal 1999 il Centro Agricoltura Ambiente (CAA) di Crevalcore (BO) in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Agrarie dell'Università di Bologna, il Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare dell'Università La Sapienza di Roma ed ENEA (Dipartimento di Biotecnologie, Agro-Industria e Protezione della Salute), Casaccia (Roma) ha avviato un progetto sul SIT applicato ad *Ae. albopictus*.

Il funzionamento della tecnica SIT richiede la produzione e il rilascio in gran numero di maschi sterili che siano in grado di competere con successo contro i maschi selvatici per l'accoppiamento con le femmine vergini selvatiche. Per questo è necessario che le varie fasi di allevamento, sterilizzazione e rilascio in campo siano accuratamente studiate e testate nei loro effetti sulle performances sessuali dei maschi.

Simulare in laboratorio le condizioni del campo è estremamente difficile.

Illuminazione, temperatura, umidità e presenza di insetti sono condizioni difficilmente riproducibili. Marchand (1985) ha provato a simulare un orizzonte artificiale per stimolare la formazione di sciami in *Anopheles gambiae* e *An. arabiensis* ma i marcatori posizionati sul fondo delle gabbie non hanno avuto effetto. Graduali cambiamenti di luce per simulare alba e tramonto sono utili ma non è chiaro quale di questi fattori possa favorire le zanzare mantenute in gabbia (Howell and Knols, 2009). E' quindi necessario testare condizioni il più possibile simili a quelle di campo.

Scopo del presente progetto di ricerca è stato quindi quello di studiare, con prove in ambiente confinato in pieno campo (serre) e aperto (aree urbane), la migliore metodica di impiego della tecnologia SIT in relazione a:

- verifica della competitività in serra di maschi allevati e irraggiati allo stadio di pupa;
- sviluppo di un dispositivo, da inserire nelle stazioni di lancio, per fornire ai maschi neo sfarfallati sostanze energetiche e stimolanti;
- definizione della dose di maschi sterili/ha necessaria a raggiungere il livello di contenimento desiderato;
- periodicità dei lanci di maschi sterili tenuto conto della loro longevità e durata dell'attività sessuale in campo;
- distanza tra le stazioni di lancio nell'ottica di assicurare una sufficiente omogeneità di maschi sterili sul territorio trattato mediante prove di lancio e ricattura di esemplari marcati.

## **1.2 Cenni di biologia ed ecologia di *Aedes albopictus***

L'adulto di *Ae. albopictus* si presenta di colore nero con tipiche striature bianche sul corpo e sulle zampe, di dimensioni tra i 4mm e i 10mm.

Il ciclo vitale (Fig. 1.3) comprende quattro stadi morfologicamente distinti:

- Uovo: nero, con una lunghezza media di 0,55 millimetri e una larghezza media di 0,16 millimetri.
- Larva: acquatica. Ha una struttura vermiforme ed è apode, caratterizzata da setole antennali semplici, squame dell'VIII urite con un'unica grossa spina centrale, disposte in un'unica fila, sifone respiratorio con indice inferiore a 4 e spazzola ventrale dell'urite anale con quattro paia di setole.
- Pupa: stadio in cui la zanzara non si alimenta, ma è comunque molto mobile.
- Adulto: ha il corpo nero lucido, con una banda bianca longitudinale sul dorso del torace e del capo e tarsi delle zampe metatoraciche con banda bianca basale sui primi quattro tarsomeri.

Nel suo habitat naturale la zanzara tigre vive e si riproduce in ambienti di foresta umida, ricchi di piccoli ristagni d'acqua in cui deporre le uova. Nelle zone urbane italiane ha trovato un ambiente favorevole grazie alla miriade di pozzetti, caditoie, tombini e sottovasi che possono creare quei piccoli ristagni di cui ha bisogno.

Le uova vengono deposte poco sopra la superficie del liquido e schiudono in risposta alla loro immersione. Questo permette loro di rimanere quiescenti per molto tempo finché il livello dell'acqua non le raggiunge. Questa modalità consente alle zanzare tigre di superare nel loro ambiente naturale l'inconveniente dell'altalenante disponibilità d'acqua e, nel nostro territorio, di superare l'inverno, oltre che infestare i piccoli ristagni già citati.

Dalle uova schiudono le larve che, attraverso 4 stadi di crescita, separati da altrettante mute, raggiungono lo stadio di pupa. Le uova deposte in estate si schiudono nel giro di pochi giorni, mentre quelle deposte in autunno possono entrare in diapausa e schiudersi alla primavera successiva. La zanzara adulta sfarfalla circa 48h dopo l'impupamento. L'intero ciclo, alle nostre latitudini, dura tra 10 e 20 giorni, a seconda della temperatura.

Le femmine effettuano il primo pasto di sangue, necessario per la maturazione delle uova, generalmente dopo l'accoppiamento.

Oltre al pasto di sangue, che provvede a fornire l'apporto proteico necessario allo sviluppo delle uova, sia i maschi che le femmine si nutrono di nettare floreale, che fornisce un vero e proprio sostentamento energetico. Gli adulti vivono da pochi giorni a parecchie settimane, a seconda delle condizioni climatiche. Il caldo torrido e la siccità riducono la longevità a pochi giorni. In queste situazioni le zanzare cercano rifugio nei pressi delle abitazioni e dei giardini irrigati, dove trovano un ambiente più favorevole alla sopravvivenza e alla riproduzione (Hawley, 1988).

Una femmina di zanzara tigre può deporre tra 60 e 100 uova dopo avere effettuato un pasto di sangue. Generalmente si ha una deposizione a settimana. Il numero medio di uova deposto da una femmina nel corso della sua vita è di circa 300-400.

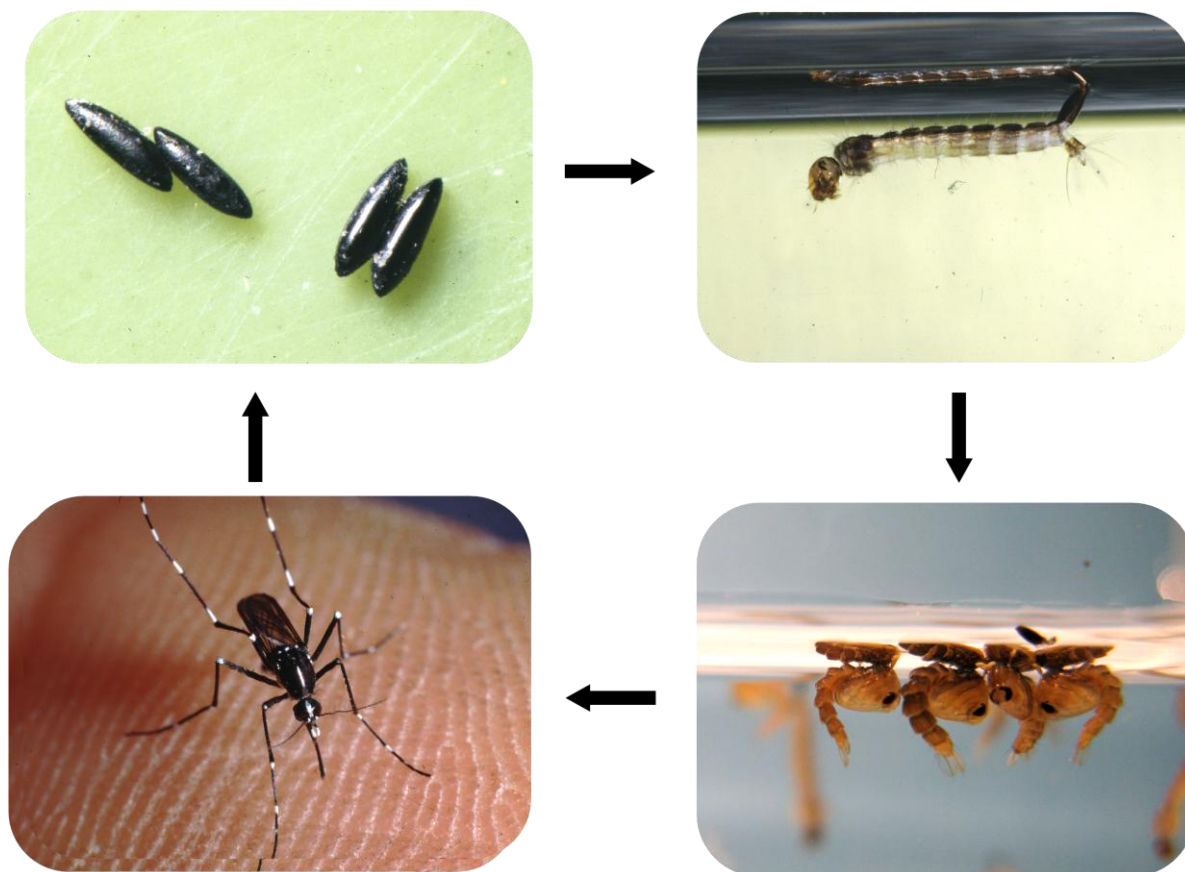


Fig. 1.3 - Ciclo vitale di *Ae. albopictus*

La femmina ha una scarsa attitudine al volo, si sposta solo di poche centinaia di metri dai sito di sfarfallamento. Questo aspetto è di fondamentale importanza nella scelta della strategia di lotta con la tecnica dell'insetto sterile.

In Italia gli adulti sono presenti nei mesi estivi e ad inizio autunno; lo svernamento avviene allo stadio di uovo. Le uova diapausanti schiudono in primavera (aprile-maggio) quando le condizioni climatiche (n° di ore di luce e temperatura) ritornano favorevoli, dando origine alla prima generazione larvale. In questa fase la densità di popolazione è ancora piuttosto bassa, mentre aumenta durante l'estate e arriva alla massima diffusione nei mesi di Agosto - Settembre.

## 1.3 Sorveglianza e strategie di lotta attualmente in uso

### 1.3.1 Monitoraggio con ovitrappole

In Italia la sorveglianza della zanzara tigre viene condotta mediante l'utilizzo di ovitrappole costituite da contenitori di colore nero riempiti di acqua e forniti di una listella di masonite adatta alla deposizione delle uova (Fig. 1.4). Ogni 2 settimane le listelle vengono sostituite ed esaminate per stimarne la densità di popolazione (Bellini et al., 1996).



Fig. 1.4 - Ovitrapola e listella di masonite con uova

### 1.3.2 Lotta antilarvale

Oltre alle caditoie stradali, le aree private costituiscono la maggior parte dei siti a rischio in quanto presentano numerosi microfocolai idonei allo sviluppo di *Ae. albopictus*. Il numero di generazioni e la popolazione che si sviluppa in queste zone è sicuramente maggiore di quella che si sviluppa dalle caditoie pubbliche pertanto, per ottenere un controllo efficace, sarebbe necessario estendere le attività di lotta anche alle aree private.

I prodotti larvicidi sono necessari per trattare i focolai che non si possono eliminare e nei quali permane l'acqua. Il mercato offre gli stessi formulati larvicidi ad uso

professionale anche in confezioni per l'uso domestico. Tra i principi attivi presenti sul mercato i più affidabili per l'impiego nella tombinatura risultano attualmente Diflubenzuron e Pyriproxyfen che uniscono buona efficacia e persistenza d'azione a bassa tossicità (Colonna et al., 2004). Il *Bacillus thuringiensis israelensis* non è consigliabile per scopi professionali nelle tombinature per la scarsa persistenza delle formulazioni attualmente in commercio, ma è suggerito per l'uso domestico visto il suo profilo tossicologico di grande sicurezza. Per le vasche ornamentali si è appurato che i comuni pesci rossi (*Carassius auratus*) e la gambusia (*Gambusia holbrooki*) svolgono una predazione efficace, completa e duratura. Inoltre, si sta mettendo a punto un sistema di lotta biologica basato sull'impiego di copepodi predatori delle larve giovani (Rodolfo Veronesi, comunicazione personale).

### **1.3.3 Azione larvicida del rame**

Sono state condotte prove, in laboratorio, per valutare l'effetto del rame sullo sviluppo di *Ae. albopictus* nei sottovasi (Bellini et al., 1998) e si è visto che 8g/l di filo metallico posto in sottovasi contenenti torba determinavano una mortalità larvale del 100% fino a 5 mesi. Il tempo di sviluppo larvale era inoltre raddoppiato determinando una forte mortalità e una riduzione del numero di generazioni durante una stagione.

Studi condotti in campo hanno evidenziato, oltre a una riduzione della densità larvale, anche un calo dei sottovasi colonizzati. Tuttavia l'uso del rame non è consigliato nei tombini o in grandi raccolte d'acqua in quanto, oltre a una scarsa efficienza, si profila il rischio di impatto ambientale dovuto al rilascio di metallo pesante.

### **1.3.4 Trattamenti adulticidi**

L'utilizzo di insetticidi da nebulizzare andrebbe messo in atto solo in situazioni straordinarie, in caso di una presenza elevata di adulti in siti sensibili (scuole, ospedali, strutture residenziali e protette) o in presenza di rischio epidemico. Questi prodotti, infatti, hanno una bassa persistenza ambientale e quindi non garantiscono una buona

protezione di lungo periodo. Al tempo stesso, si tratta di prodotti dalla scarsa specificità e che possono quindi avere un impatto ambientale piuttosto elevato. La ricerca in questo settore indica come preferibili formulati a base di piretrine naturali e piretroidi.

### **1.3.5 Metodi di lotta genetici**

Una delle maggiori difficoltà che si riscontra nella lotta ad *Ae. albopictus* è quella di arrivare ad interessare tutti i focolai presenti nelle aree private. I trattamenti effettuati sul suolo pubblico non risultano efficaci nel contenerla.

Per questo motivo, negli ultimi anni, si stanno rivalutando tecniche di lotta genetiche rivolte allo stadio adulto dell'insetto da combattere per inibirne la funzione riproduttiva.

In queste tecniche rientra quella dell'insetto sterile (SIT).

## **1.4 Tecnica dell'insetto sterile**

Il SIT è basato sul concetto di rilasciare maschi sterilizzati ma sessualmente competitivi che si accoppino con le femmine selvatiche in modo che producano uova sterili quindi riducano, nel tempo, la popolazione vettore.

L'ideazione della tecnica può essere attribuita a Edward F. Knipling (Knipling et al., 1955), il quale avanzò l'ipotesi che se i maschi sterili vengono rilasciati inizialmente in numero tale da causare un declino della popolazione selvatica, con il rilascio prolungato di un numero costante di maschi sterili ad ogni generazione si raggiungerà un grado progressivamente maggiore di soppressione della popolazione selvatica in ogni successiva generazione.

Secondo un modello sviluppato da Knipling, partendo da una popolazione autoctona di un milione di insetti femmine e liberando in questa popolazione due milioni di maschi sterili per generazione, l'eradicazione totale dovrebbe essere realizzata in

cinque generazioni. In contrasto, un insetticida ad una dose costante tende ad uccidere la stessa frazione di una popolazione di insetti in tutte le densità di popolazione.

Inoltre, Knippling ipotizzò che il SIT potesse essere integrato con altri mezzi di lotta chimici, biologici o culturali per il controllo della popolazione in modo da ridurre la densità degli insetti target e favorire quindi l'efficacia degli insetti sterili.

Il SIT infatti, come altri metodi genetici, diventa progressivamente più efficace con il diminuire della densità di popolazione della specie bersaglio (Waldermar, 2009).

Nonostante il nome, gli insetti usati nel SIT non sono strettamente sterili, nel senso di sterilità agamica. Piuttosto, essi sono in grado di accoppiarsi, ma la progenie risultante dall'accoppiamento tra gli insetti sterili e gli insetti selvatici non è vitale.

Oggi sono disponibili diversi metodi di sterilizzazione:

- radiazioni, che sono utilizzate in molti programmi agricoli. Le radiazioni generano casuali mutazioni dominanti letali nei gameti interessati;
- incompatibilità citoplasmatica indotta da *Wolbachia* (Brelsfoard et al., 2008), in cui ci sono barriere di intersterilità tra maschio e femmina a seconda dello stato di infezione di *Wolbachia*;
- metodi del DNA ricombinante, ad esempio, l'uso di mutazioni letali dominanti (RIDL = Release of Insects with a Dominant Lethal) che portano la progenie a essere non vitale se non dispone di un antidoto adeguato (Thomaset al., 2000, Alphey et al. 2007, Phuc et al., 2007). L'effetto letale è femmina-specifico, quindi solo la progenie femminile muore.

Il RIDL è già stato utilizzato in *Drosophila* (Alphey & Andreasen 2002) ed è in fase di sviluppo per *Aedes aegypti*, vettore di *Dengue* e febbre gialla.

L'utilizzo di maschi sterili per controllare le popolazioni di zanzare vettori può essere efficace solo nel quadro di un programma di IPM-Area Wide. Si richiede, inoltre, una conoscenza approfondita della biologia delle popolazioni bersaglio in particolare per quanto riguarda il comportamento di accoppiamento, la dinamica di popolazione, la dispersione e il livello di isolamento riproduttivo. Le sfide chiave per il successo (Robinson et al., 2008) sono:

- 1) la definizione di metodi per monitorare le popolazioni del vettore target e misurare la competitività dei maschi sterili in campo;



- 2) la progettazione di un allevamento massale, la sterilizzazione e le strategie di rilascio per mantenere alta la competitività delle zanzare maschio sterili;
- 3) lo sviluppo di metodi per separare i sessi, al fine di rilasciare solo zanzare maschio;
- 4) adeguare le misure di soppressione e dei tassi di rilascio tenendo in considerazione l'elevato tasso riproduttivo delle zanzare.

Infine, il successo può essere raggiunto solo se è rivolta particolare attenzione alla sensibilità politica, socio-economica e ambientale.

#### **1.4.1 SIT su altri insetti**

Il SIT ha dimostrato di essere una tecnologia molto efficace e ha avuto successo nel controllo e nell' eradicazione di importanti insetti come, ad esempio, la mosca del bestiame *Cochliomyia hominivorax* Coquerel, un dittero calliforide particolarmente dannoso per gli allevamenti di bestiame. Le femmine sono monogame quindi, una volta accoppiatesi con maschi sterili, rimangono sterili tutta la vita.

Knipling suggerì per primo l'idea che *C. hominivorax* potesse essere eradicata dal sud degli Stati Uniti con la tecnica del maschio sterile. Bushland e Hopkins (1953) trovarono che i maschi di *C. hominivorax* erano molto sensibili alle radiazioni: erano sufficienti 25 Gy per renderli sterili mentre le femmine richiedevano una dose più alta (65 Gy). Le pupe di 5-6 giorni di età risultavano sensibili a dosaggi simili, per cui diventava vantaggioso maneggiarle.

E' del 1954 il primo successo nell'applicazione della tecnica SIT contro *C. hominivorax* a Curacao, un'isola di 500 km<sup>2</sup> al largo del Venezuela (Baumhover et al., 1955), in Florida nel 1959 e a seguire in tutto il sud degli USA e negli stati del Centro America (Whitten e Foster, 1975; Wyss, 2000). Appositi accordi sono stati sottoscritti tra USDA e i vari governi nazionali che intendevano usufruire dell'appoggio statunitense sulla base di una compartecipazione 80-20 % rispettivamente. Questo investimento era considerato vantaggioso anche per gli Stati Uniti in quanto in grado di allargare la fascia di protezione libera dalla mosca al sud del paese riducendo in questo modo il rischio di reinvasione negli Stati Uniti.

Nella fase iniziale la sterilizzazione dei maschi si otteneva tramite raggi X, poi si passò al Co60 (dosaggi compresi tra 5.000 e 7.500 r) ed infine al Cesio 137. Varie prove dimostrarono una sostanziale equivalenza tra raggi X e raggi gamma (Bushland e Hopkins, 1953).

Nel 1988 si registrò l'introduzione accidentale della specie in Libia, dove in pochi mesi il numero di casi riportati mostrò la tipica curva a iperbole. Il gruppo di lavoro congiunto FAO/IAEA fu in grado di sviluppare un efficace programma di eradicazione basato sul materiale allevato in Messico. I primi lanci furono effettuati nel dicembre del 1990 ed arrivarono a un picco di 40 milioni di mosche lanciate a settimana. Nel luglio 1991 la Libia fu dichiarata libera dalla specie.

Risulta sia tuttora in corso il progetto di eradicazione della specie da tutto il Centroamerica (<http://www.fao.org/ag/Aga/AGAP/FRG/FEEDback/War/u4220b/u4220b0j.htm>).

Il primo impianto massale si trovava in Texas, mentre dal 1976 divenne operativo l'impianto di Tuxtla in Messico con una capacità produttiva dell'ordine di 40-100 milioni di mosche alla settimana (Wyss, 2000). Essendo dal 1991 il Messico liberato della mosca vi è il rischio di fughe accidentali dall'allevamento il che fa considerare con favore la dislocazione dell'impianto in un'area infestata.

A livello mondiale la tecnica dell'insetto sterile fu in seguito sviluppata e utilizzata con successo su altre specie di insetti, tra questi *Laspeyresia (Cydia) pomonella* nella Columbia Britannica, con un progetto operativo nel periodo 1962-72 su un'area frutticola di circa 11.000 ettari (Whitten e Foster, 1975).

La sterilizzazione era condotta con raggi gamma e i lanci venivano effettuati con un mezzo aereo. La dose di lancio stimata come idonea a contenere la popolazione entro livelli non dannosi era di 40 : 1 (sterili : fertili). Fu possibile appurare la convenienza nel ridurre i dosaggi di raggi gamma entro valori di 25-30 krad in modo da ottenere maschi sessualmente più competitivi anche se non completamente sterili; infatti le larve F1 derivanti da questi maschi erano inette a sopravvivere in campo (Whitten e Foster, 1975). Il progetto venne dismesso perché più costoso nel breve periodo rispetto alla lotta chimica, non essendo accettata e condivisa l'idea di investire per alcuni anni con l'obiettivo di eradicare il lepidottero.

Nella California meridionale è attivo dal 1994 un programma SIT finalizzato a prevenire la diffusione di *Ceratitis capitata* attraverso il lancio massale giornaliero

continuato di individui sterili (Barry et al., 2004). L'area interessata è di oltre 6.000 kmq, il costo annuo del progetto di 18,6 milioni di \$ a fronte di un danno per il settore agricolo stimabile in 1,3-1,9 miliardi di \$ nel caso di colonizzazione permanente della mosca.

Analogo programma di prevenzione risulta tuttora attivo in Florida dopo l'eradicazione della specie avvenuta nel 1998. Vengono lanciate per via aerea 100 milioni di pupe/settimana con un budget complessivo di 3,4 milioni di \$ (riferito all'anno 2002) (<http://www.doacs.state.fl.us/pi/methods/images/sirfboohlet.pdf>).

Su *C. capitata* è stato possibile individuare che l'esposizione dei maschi sterili all' $\alpha$ -copaene, un sesquiterpene presente nell'olio di radici di zenzero (*Zingiber officinale* Roscoe), aumenta la loro capacità di accoppiamento con le femmine (Flath et al., 1994).

Sembrano inoltre presenti delle popolazioni caratterizzate da esigenze specifiche in fase di accoppiamento, il che richiederebbe l'impiego di ceppi della stessa origine geografica delle popolazioni da sopprimere (Shelly et al., 2003).

Gli impianti massali di *C. capitata* nel mondo attualmente operativi sono a El Pino (Guatemala) dove si alleva il ceppo VIENNA 7/Tol-99, con una capacità produttiva fino a 2 miliardi di maschi / settimana e un costo di mercato di circa 275 \$ / milione di pupe; Mendoza (Argentina) dove si alleva un ceppo tsl con una capacità fino a 100 milioni di maschi / settimana; Madeira dove si alleva un ceppo tsl (VIENNA 7/Mix-2000); Australia dove si alleva un ceppo tsl (VIENNA 7/Mix 99) con una capacità fino a 5 milioni di maschi / settimana; Sud Africa dove si alleva VIENNA 7/Mix 99 con una capacità produttiva fino a 6 milioni di maschi / settimana. Sono inoltre attivi altri grossi impianti nelle Hawaii che forniscono il materiale per il programma di prevenzione in corso in California e in Messico. Tutti i più importanti allevamenti SIT di *C. capitata* impiegano attualmente ceppi tsl che hanno permesso di eliminare le femmine nella fase iniziale dell'allevamento e, cosa molto importante, di eliminare il danno che le femmine sterili causavano ai frutti con l'inserzione dell'ovopositore (Hendrichs et al., 1995; Robinson, 2002).

La mosca delle cucurbitacee *Bactrocera cucurbitae* che aveva invaso le isole sudoccidentali del Giappone nel periodo 1919-1974, causando ingenti danni all'agricoltura, è stata eradicata con un programma SIT attivo nel periodo 1972-1993 (Koyama et al., 2004).

Di grande interesse appare la possibilità di applicazione della tecnica SIT sul complesso delle mosche tsetse, che in linea teorica e anche dalle prove condotte ben si

prestano alla metodica (<http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2022E/y2022e02.htm>). Un progetto pilota, condotto nell'isola di Zanzibar da IAEA mediante impiego di raggi gamma e lancio aereo dei maschi sterili due volte la settimana nel periodo 1994-'97, ottenne l'eradicazione di *G.austeni* (Vreysen et al., 2000).

#### 1.4.2 SIT su zanzare

Dalla metà degli anni '50 fino alla metà degli anni '70 sono state condotte numerose ricerche per il controllo delle zanzare mediante la tecnica dell'insetto sterile (v. tabella 1.1 da: Mark Q. Benedict and Alan S. Robinson TRENDS in Parasitology Vo1.19 No.8 August 2003).

Una serie di successi in campo su scala ridotta sono stati condotti con diverse specie di *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (Klassen et al., 2005).

Le prove più importanti sono state condotte in El Salvador e in India. Purtroppo, entrambi questi studi sono stati interrotti a metà degli anni '70, prima di essere completati. In El Salvador il lavoro si è concluso a causa della guerra civile, in India per la diffusione del sospetto che il progetto avesse lo scopo di raccogliere dati per la guerra biologica.

In El Salvador, l'obiettivo era il vettore della malaria *Anopheles albimanus*, e il lavoro è stato condotto da un team del Laboratorio del Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti, Gainesville, Florida. La popolazione selvatica era diventata resistente agli insetticidi, quindi difficile da controllare con mezzi convenzionali. Inizialmente, i rilasci di maschi sterili nei primi cinque mesi intorno al Lago Apastapeque sono riusciti a indurre il 100% di sterilità delle uova deposte da femmine selvatiche. Successivamente, la separazione dei sessi grazie all'utilizzo del sessaggio genetico è stata notevolmente migliorata, consentendo in tal modo un raddoppio della produzione maschile per il rilascio. Il trattamento con Propoxur allo stadio di uovo ha permesso di selezionare solo lo 0,2% di femmine e il rilascio di maschi sterili è aumentato da 200.000 a oltre un milione di maschi al giorno. I lanci in campo hanno ridotto la popolazione bersaglio di oltre il 97%.

In India, il lavoro svolto da Chris Curtis ha dimostrato che due importanti specie vettrici culicine (*Culex pipiens quinquefasciatus* ed *Aedes aegypti*) possono essere oggetto

di allevamento massale e che i sessi possono essere separati in base alle dimensioni della pupa per garantire che il 99,8% degli insetti rilasciati siano maschi. In questo progetto i maschi venivano chemiosterilizzati nella fase di pupa, oppure la sterilità era prodotta da incompatibilità citoplasmatica. I test sul campo hanno dimostrato che la competitività di accoppiamento dei maschi di entrambe le specie era accettabile. Tuttavia, il rilascio in massa dei maschi di *Cx. quinquefasciatus* ha raggiunto soltanto livelli limitati di sterilità nelle uova deposte da femmine selvatiche a causa dell'afflusso di femmine già accoppiate dall'esterno dell'area di rilascio. Il rilascio massale previsto di maschi sterili di *Ae. aegypti*, finalizzato alla eradicazione di questa zanzara urbana da una città intera, è invece stato impedito dal problema politico di cui sopra.

L'immigrazione delle femmine già fecondate dai maschi fertili al di fuori della zona di lancio è uno dei principali ostacoli al progresso per programmi che utilizzano gli insetti sterili. Nel caso dell'eradicazione in Nord America di *C. hominivorax*, questo problema è stato superato da programmi di eliminazione su larga scala.

Negli anni 1959-62 fu condotta un'esperienza su *Anopheles quadrimaculatus* in Florida (Weidhaas et al., 1962; Dame et al., 1964) che fornì scarsi risultati. Ricerche successive mirate a stabilire le cause di questo insuccesso ipotizzarono che i maschi sterili avessero avuto difficoltà a disperdersi ed entrare in contatto con le femmine vergini selvatiche, difficoltà attribuibile più alla selezione del ceppo colonizzato che non all'effetto depressivo delle radiazioni o della chemiosterilizzazione.

Tab. 1.1 - Mosquito releases related to sterile insect technique (da Benedict e Robinson, 2003).

| Target                         | Year      | Location                            | Sterility    | No.realised                            | Objective                                       | Outcome  |
|--------------------------------|-----------|-------------------------------------|--------------|--|---|--|
| <i>Aedes aegypti</i>           | 1960-1961 | Pensacola, FL, USA                  | Ga           | 4.6 million over 43 wks                | Population reduction                            | Despite extremely overwhelming ratios of release to wild material. No effect could be concluded.                                   |
|                                | 1967      | Meridian, MS, USA                   | Ma           | 17.000 fertile males over 2 wks        | Morphological allele introgression              | Out of 1084 eggs, two matings were to marked individuals.  |
|                                | 1971      | Model Basti, India                  | Tr           | 30.000 translocation males over 4 wks  | Persistence of translocation in wild population | Males were competitive and introgression of marker allele was observed   |
|                                | 1971      | Shari Nagar, India                  | Ma           | ~ 50.000 marked males over 4 wks       | Allele introgression in wild population         | Males were competitive and introgression of marker allele was observed   |
|                                | 1974      | Delhi, India                        | Ch, Tr or Sg | 40.500 in 3 experiments of 6 days each | Male mating competitiveness                     | Males were competitive.  |
|                                | 1974      | Mombassa, Kenya                     | Tr           | 57.000 over 10 wks                     | Population reduction and semi-sterility         | Semi-sterility, but there was no long-term persistence of translations nor a great effect on pupa and adult population.            |
|                                | 1975      | Mombassa, Kenya                     | Tr           | 31.500 over 9 wks                      | Population reduction and dynamics               | Released males mated wild females, but eggs from these were not deposited in ovitraps, and hybrid progeny did not survive to pupa. |
| <i>Aedes albopictus</i>        | 1990-1991 | E.St.Louis, IL, USA                 | Ma           | 21.000 males in 3 releases             | Diapause and rare electromorph itrogression     | Evidence of introgression.   |
| <i>Culex pipiens</i>           | 1970      | Nore Dame, near Montpellier, France | Tr           | 100 s of thousands over 8 wks          | Population reduction and semi-sterility         | Persistence of translation and population reduction were observed.   |
| <i>Culex quinquefasciantus</i> | 1967      | Okpo, Myanmar                       | Cl           | 5.000 daily for 9 wks                  | Population elimination                          | Population eliminated.   |
|                                | 1968      | Seahorse Key, FL, USA               | Ch           | 2.500 males over                       | Population reduction                            | Increased sterility, but plateau in the number of egg rafts.   |
|                                | 1969      | Seahorse Key, FL, USA               | Ch           | 930.000 males over 12 wks              | Population reduction                            | Population suppression and/or elimination due in part to sterile male release.   |

Tab. 1.1 – continua

| Target                         | Year | Location                      | Sterility     | No.realised                                  | Objective   | Outcome  |
|--------------------------------|------|-------------------------------|---------------|--|---|--|
| <i>Culex quinquefasciatus</i>  | 1973 | Village near Delhi, India     | CI + Tr or Ch | 11400 males in 2 experiments of 9 or 10 days | Male mating competitiveness                                     | Males were competitive.  |
|                                | 1973 | Village near Delhi, India     | Tr + CI       | ~ 23 million males over 14 wks               | Population reduction, and sterility due to CI and translocation | Sterility due to CI and translocation with population reduction.   |
|                                | 1973 | Village near Delhi, India     | Ch            | 38 million males over 25 wks                 | Population reduction, and sterility                             | Up to 90% sterile egg rafts, but no clear population suppression.  |
| <i>Culex tarsalis</i>          | 1977 | CA, USA                       | Tr            | 76.000 males over 4 wks                      | Population reduction  | No measurable effect.  |
|                                | 1978 | CA, USA                       | Tr            | 180 000 males over 2.5 months                | Male competitiveness  | Evidence of matings, but dispersal and competitiveness were low. No evidence of population reduction.                            |
|                                | 1979 | CA, USA                       | Ga            | 13.000 males in one release                  | Population reduction  | Increased egg-batch sterility.   |
|                                | 1981 | CA, USA                       | Ch            | 85.000 males over 8 wks                      | Population reduction and mating behavior                        | Assortative mating was observed and there was no population reduction.   |
|                                | 1982 | CA, USA                       | Ma            | 159.000 males and females over 6 wks         | Introgression of carmine eye color mutation                     | Allele frequency increased and persisted at a low level for up to 2 years after releases ended.                                  |
| <i>Culex tritaeniorhynchus</i> | 1977 | Punjab Province, Pakistan     | Tr            | 167.000 over 2 wks                           | Male competitiveness  | Males competed well for laboratory-reared females, but not wild females. Immigration prevented evidence of population reduction. |
| <i>Anopheles albimanus</i>     | 1972 | Lake Apastepeque, El Salvador | Ch, Ga        | 100s millions males during 1977-1979         | Population reduction  | Population suppressed in contracted release area, but unexpected immigration believed to reduce effect.                          |
| <i>Anopheles culicifacies</i>  | 1979 | Pakistan                      | Tr            | 3.100 males in one release                   | Mating with wild and released colony females                    | Assortative mating did not appear to have been selected during the (difficult) colonization process. Males were competitive.     |
|                                | 1980 | Pakistan                      | Ch            | 7.500 males in 1 wk                          | Mating with wild and released colony females                    | Males were less competitive, but dispersal, swarming and mating were observed.   |

Tab. 1.1 – continua

| Target                           | Year      | Location                  | Sterility | No.realised                              | Objective  | Outcome  |
|----------------------------------|-----------|---------------------------|-----------|--|--|--|
| <i>Anopheles gambiae</i>         | 1968-1969 | Burkina Faso              | Hy        | 240.000 over 9 wks                       | Population reduction                                       | No significant effect on egg-batch sterility. Dispersal was high, but male competitiveness was poor. |
| <i>Anopheles quadrimaculatus</i> | 1959-1960 | FL, USA                   | Ch        | 433.600 males over 48 wks at 2 locations | Population reduction and semi-sterility                    | No population reduction, and no or little semi-sterility was observed.                               |
|                                  | 1962-1963 | PanasoffkeeCreek, FL, USA | Ch        | 50.000 colony and wild males             | Male competitiveness, behaviour, and sterilization methods | Mating with wild and colony females was observed.  |

Abbreviazioni: Ch, chemosterilization;  
 CI, cytoplasmic incompatibility;  
 Ga, gamma irradiation;  
 Hy, hybrid male sterility;  
 Ma, marker only (i.e. no sterility intended);  
 Sg, segregation distorter;  
 SIT, sterile insect technique;  
 Tr, translocation and other chromosomal rearrangements.

Nel sud della California, negli anni 1977-1983, fu condotto uno studio per l'applicazione della tecnica SIT contro *Cx. tarsalis*. In questa sperimentazione fu possibile verificare che le radiazioni necessarie alla sterilizzazione dei maschi avevano scarsi effetti negativi sulla capacità di accoppiamento con femmine selvatiche in gabbia (Zalom et al., 1981), mentre il peso negativo della colonizzazione appariva determinante (Reisen et al., 1980; 1982). Irraggiando i maschi raccolti come pupe in natura con raggi gamma alla dose di 60 Gy si induceva nella popolazione selvatica una sterilità pari a quella attesa sulla base di competizione 1:1 (Reisen et al., 1981). Utilizzando invece materiale in allevamento da 9-16 generazioni la sterilità indotta nella popolazione selvatica era più bassa, indicando una competitività dei maschi sterili del 29%.

Analizzando i motivi che incidevano negativamente sul comportamento dei maschi in campo Reisen et al. (1985) osservarono che la colonizzazione selezionava ceppi più adatti a formare sciame di accoppiamento in gabbia ma che avevano scarse capacità di formare sciame di accoppiamento in natura.



### 1.4.3 SIT su *Aedes albopictus* in Italia

Da alcuni anni CAA “G. Nicoli” svolge studi specifici sull'utilizzo del SIT contro *Ae. albopictus* in Italia.

Come già detto in precedenza, le caratteristiche biologiche ed ecologiche di questa specie ne fanno una buona candidata per l'applicazione di questa tecnica all'interno di programmi di gestione integrata (IPM= Integrated Pest Management).

In particolare sono stati condotti studi sul rapporto dose/effetto, sulla fitness, sul recupero di fertilità dei maschi irraggiati utilizzando dosaggi di radiazioni nel range 30-110 Gy (Bellini et al., 2005; Balestrino et al., 2010). Sono stati realizzati studi sull'età delle pupe più convenienti per l'irraggiamento, è stata valutata in laboratorio in gabbie di allevamento e in serre la competitività dei maschi sterili vs maschi fertili. Infine sono state realizzate prove in campo in piccoli centri abitati del Nord Italia (Bellini et. al., 2007).

Le valutazioni dell'efficacia di questo sistema di lotta vengono condotte attraverso la raccolta di uova deposte dalle femmine selvatiche e la verifica del loro livello di fertilità. Le uova vengono raccolte mediante ovitrappole specifiche attraverso una metodica ampiamente standardizzata e validata (Bellini, 2005). Il loro livello di fertilità viene valutato mediante schiusura in laboratorio adottando un protocollo sviluppato appositamente ed in grado di fornire dati precisi ed attendibili.

Nelle sperimentazioni finora condotte sono state rilasciate pupe maschio sterili alla densità di 1.000-2.000 maschi / ha / settimana, ottenendo forti riduzioni stagionali del livello di fecondità delle uova (nell'ordine del 60-70% rispetto ai valori riscontrati nelle aree testimone), con riduzioni altrettanto elevate del numero di uova raccolte rispetto ad analoghe zone non trattate. Ciò dimostra quindi che i maschi sterili rilasciati sono in grado di competere coi maschi selvatici e di indurre sterilità nella popolazione target, e questa sterilità indotta si ripercuote sulla densità di popolazione della zanzara.

Gli adulti utilizzati per le prove sono allevati in gabbie di Plexiglas (50x50x50 cm) in condizione standard di allevamento: 27±1°C, 85% umidità relativa, 15-9 h luce-buio.

Le femmine vengono nutrite con sangue fresco meccanicamente defibrinato usando uno speciale apparecchio termostato. Le uova vengono deposte su carta e mantenute per alcuni mesi in contenitori di plastica con una soluzione satura di K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Al momento del bisogno, la carta su cui sono deposte le uova viene messa in acqua per la schiusura. Le larve vengono nutrite con una nuova dieta sviluppata in collaborazione con l'Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica (IAEA) di Vienna, raccolte in vaschette di plastica contenenti acqua dechlorata e arieggiate mediante tubi di aereazione.

Allo scopo di ottenere larve ad una densità prefissata, è stato sviluppato un metodo automatico e rapido per il conteggio delle uova utilizzando un programmi di analisi delle immagini (ImageJ - US National Institute of Health).

Un metodo pratico per standardizzare la schiusura delle uova è stato sviluppato in modo da ottenere un numero preciso di larve di primo stadio partendo da un numero conosciuto di uova. Una cultura di Bacto Nutrient Broth viene utilizzata per ottenere acqua deossigenata biologicamente in contenitori ermetici di vetro.

Le larve vengono allevate in vaschette bianche di plastica (41x31x11 cm) contenenti 3 litri di acqua dechlorata rifornita di aria mediante tubi di areazione. Il tempo di allevamento è accuratamente pianificato per programmare con precisione l'età al momento dell'irraggiamento.

Allo stato attuale il sessaggio viene effettuato, allo stadio di pupa, mediante setacci metallici con maglie quadrate di apertura 1.400 micron, sfruttando il naturale dimorfismo sessuale presente in questa specie.

Le pupe vengono raccolte una volta per ciclo ad un tempo fisso di 24 ore dopo l'inizio dell'impupamento per meglio sfruttare la proterandria.

Per separare le larve residue dalle pupe maschili viene aggiunto al contenitore usato per trasportare le pupe alla struttura in cui viene effettuata la sterilizzazione 1 ppm di *Bacillus thuringiensis israelensis*.

La produttività media attuale di pupe maschio è nell'intervallo del 15-20% (sul numero iniziale delle larve di prima età) con una presenza di femmine nell'ordine dell'1 %.

Le pupe vengono irraggiate con un irraggiatore al Cesio 137 presente all'ospedale S. Anna di Ferrara (CIS Biointernational<sup>®</sup> - Mod. IBL437C Type H) con una dose di 30-40 Gy.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Prima prova di dispersione

La valutazione sul campo della qualità dei maschi sterili è un punto chiave per l'applicazione e il successo di un programma di lotta autocida. Numerosi esperimenti sono stati condotti sulla dispersione delle femmine in differenti condizioni ecologiche e ambientali (Mori 1979; Craig 1994; Takagi et al., 1995; Lacroix et al., 2007). Al contrario, pochi studi sono stati compiuti sui maschi quindi sono disponibili poche informazioni sulla loro biologia ed ecologia.

Esperimenti di marcatura-rilascio-ricattura (MRR) costituiscono un possibile approccio per analizzare nell'area di lancio la capacità di dispersione dei maschi sterilizzati e la longevità degli stessi.

Il MRR consiste nel marcare i maschi prima del lancio utilizzando metodi rispettosi, rilasciarli in un sito specifico e quindi effettuare delle catture a diversa distanza dal sito di rilascio ad intervalli di tempo successivi.

Per marcare gli insetti, nel corso degli anni, sono stati sviluppati diversi materiali e tecniche (polveri, isotopi non radioattivi, metodi di marcatura genetica). In linea generale, un sistema di marcatura ottimale dovrebbe essere persistente sugli individui rilasciati per tutta la durata delle ricatture, l'applicazione del marcatore non dovrebbe influenzare o inibire la capacità di dispersione degli individui né ridurre la longevità (Hagler & Jackson, 2001). Inoltre, un efficace metodo di marcatura non dovrebbe alterare il comportamento dell'insetto o ridurre le capacità di spostamento. Insieme ad ENEA (Casaccia, Roma) e Università La Sapienza di Roma (Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare) è stato messo a punto ed utilizzato un sistema di marcatura basato sulla creazione di individui aposimbionti per il batterio *Wolbachia*.

*Wolbachia* è un simbionte intracellulare citoplasmatico ereditato per via materna presente nei tessuti riproduttivi di numerosi artropodi, con un tasso di infezione del 20-75%. *Ae. albopictus*, presenta una doppia infezione causata da due ceppi di *Wolbachia*, wAlbA e wAlbB. A differenza di altre specie che presentano un pattern di infezione eterogeneo geograficamente, tutte le popolazioni di *Ae. albopictus* conosciute al mondo

presentano la doppia infezione. Linee aposimbionti possono essere facilmente ottenute in laboratorio tramite trattamento antibiotico con tetraciclina (Calvitti et al., 2010).

Studi condotti su femmine non infette a confronto con femmine naturalmente infette con *Wolbachia* hanno mostrato un decremento nella fitness (Dobson et al., 2004).

Al contrario, i maschi di tali linee privi di *Wolbachia* non hanno evidenziato alcuna differenza tra questi e i maschi naturali infettati (Calvitti et al., 2010).

La rimozione di *Wolbachia* e il rilascio di maschi aposimbionti è stato individuato quindi quale possibile metodo di marcatura. Il principale aspetto positivo di tale sistema di marcatura risiede nella completa assenza di manipolazione dei maschi da lanciare, infatti, la rimozione del batterio *Wolbachia* e quindi la marcatura, avviene allo stadio larvale e il rilascio è effettuato allo stadio di pupa evitando il trasporto degli adulti. Gli individui aposimbionti possono però essere riconosciuti soltanto tramite analisi molecolare (amplificazione per PCR di frammenti genomici specifici di *Wolbachia*).

E' risultato quindi necessario individuare e mettere a punto un protocollo che minimizzasse i tempi di analisi e i costi di reagenti. E' stato messo a punto dall'Università La Sapienza ed utilizzato un metodo di estrazione del DNA genomico basato sull'utilizzo di una resina chelante, il Chelex. (Porretta, 2008). Tale resina, composta da copolimeri di stirene e divenilbenzene contenenti gruppi imminodiacetici associati che agiscono come gruppi chelanti, ha un'elevata affinità per gli ioni metallici polivalenti.

I maschi sono stati posti singolarmente in eppendorf da 1.5 ml, contenenti 250 µl di Chelex® 100 (BioRad) al 5%, e sono stati frammentati manualmente con pestelli. Successivamente sono stati aggiunti altri 250 µl di Chelex al 5%, e proceduto all'incubazione a bagnomaria in acqua a 100°C per 10 minuti. La presenza di Chelex durante l'ebollizione impedisce la degradazione del DNA da parte degli ioni metallici chelanti, impedendo che possano agire come catalizzatori nella rottura del DNA a temperature elevate, in condizioni di soluzioni di scarsa forza ionica. A questo punto i campioni sono stati centrifugati (Microcentrifughette 4214 ALC) a 13000 g per 5 minuti. Al termine della centrifugazione il supernatante, contenente il DNA estratto, è stato recuperato e posto a -20°C. Tale procedimento ha la durata complessiva di circa 20 minuti, esclusa la fase di frammentazione del campione, e permette di effettuare un gran numero di estrazioni nell'arco della giornata. La qualità del DNA estratto è risultata confrontabile con quella del metodo classico di estrazione mediante fenolo:cloroformio,

così come quella dei prodotti di amplificazione per PCR del gene *wsp* di *Wolbachia*, effettuata per riconoscere i maschi aposimbionti ricatturati dai maschi naturali.

La prima prova di dispersione si è svolta, in provincia di Bologna, nei comuni di Castel Maggiore, con una popolazione di 13.769 abitanti, una densità media di 6.551 abitanti/Km<sup>2</sup> e 1.222 case in un'area di 2,1 Km<sup>2</sup> e Castello d'Argile, con una popolazione di circa 2.964 abitanti, una densità media di 2.298 abitanti /Km<sup>2</sup> e 709 case in un'area di 1 Km<sup>2</sup>. Le due località presentano caratteristiche simili: hanno un piccolo centro abitato circondato da campagna e abitazioni più sparse con grande presenza di vegetazione.

I lanci in campo per la verifica della capacità di dispersione sono stati effettuati utilizzando maschi provenienti da un ceppo di allevamento mantenuto in condizioni standard (Bellini et al., 2007), alimentato con una dieta composta da: 80% cibo secco per cani Friskies®, 14% lievito and 6% cibo per pesci Tetramin® e privato del simbionte *Wolbachia*.



Fig. 2.1- Stazione di lancio maschi

Sono stati lanciati, in entrambi i Comuni, circa 1200 maschi. I lanci in campo sono stati realizzati mediante disposizione sul terreno, in luoghi protetti, di vasi in plastica (Fig. 2.1) contenenti le pupe sterili in acqua (stazioni di lancio).

A Castel Maggiore sono stati liberati maschi fertili senza *Wolbachia*; a Castello d'Argile sono stati rilasciati maschi privi di *Wolbachia* e sottoposti ad irraggiamento a 30 Gy (Balestrino et al. 2010).

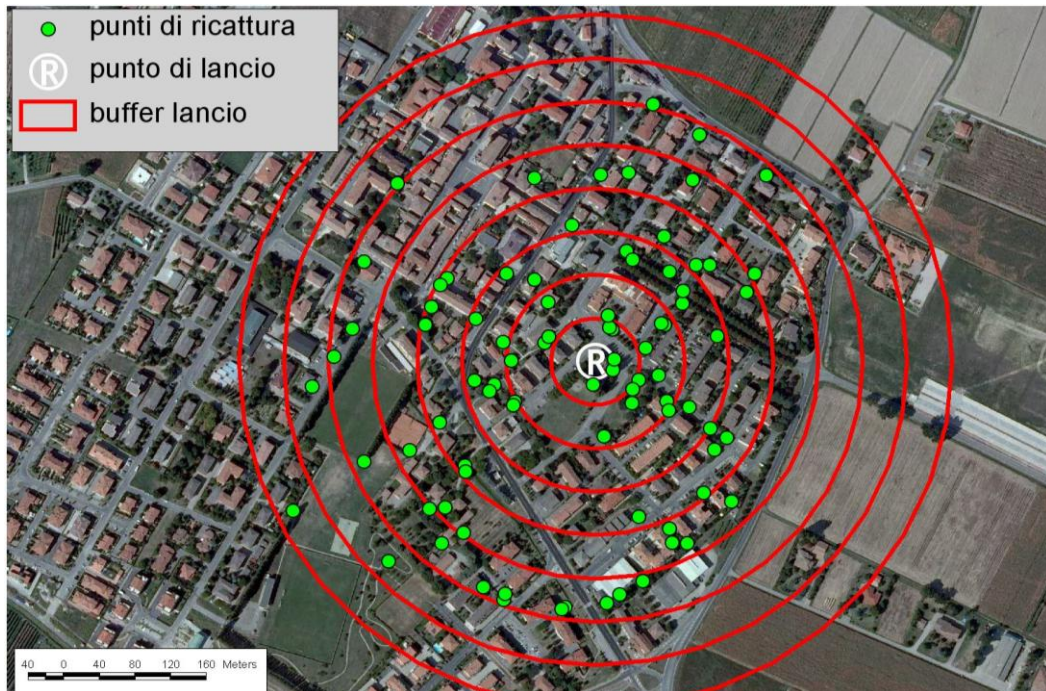


Fig. 2.2 - Punti ricattura Castello d'Argile (M sterili)

La ricattura dei maschi è avvenuta, in entrambe le località, a distanza di tre, cinque e sette giorni dal lancio, dalle 16,30 alle 19,30, periodo di maggiore attività di *Ae. albopictus*, da squadre di operatori provvisti di aspiratori, retino per la cattura di sciame e GPS (Bellini et al., 2010) che si muovevano sul territorio cercando i siti più favorevoli alla presenza dei maschi, in un raggio di 350m dal punto di rilascio (Figg. 2.2 e 2.3).

I punti di rilascio e di ricattura sono stati georeferenziati tramite GPS (Holux GR-230 bluetooth GPS Receiver, Holux Technology, Hsinchu, Taiwan). Tutte le coordinate sono state immesse in un sistema geografico d'informazione (ESRI Arc View 3.3) per calcolare le distanze tra i siti di rilascio e quelli di ricattura.



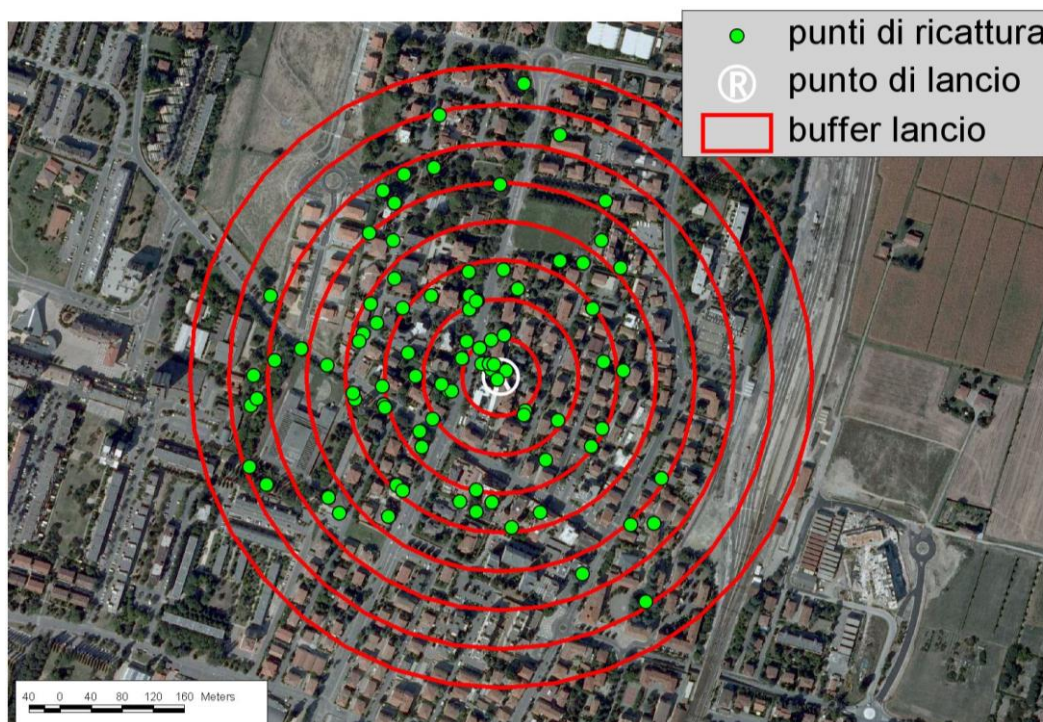


Fig. 2.3 - Punti ricattura Castello Maggiore (M fertili)

Il riconoscimento dei maschi aposimbionti catturati è avvenuto mediante PCR presso il Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare dell'Università "La Sapienza" di Roma.

## 2.2 Prove di alimentazione maschi

Uno dei momenti più delicati della metodica di lotta del maschio sterile è la fase di lancio dei maschi irraggiati e la loro sopravvivenza nelle prime ore dopo lo sfarfallamento.

Le informazioni disponibili sul metabolismo energetico delle zanzare sono scarse e riferite, per lo più, alle zanzare femmine.

Molte zanzare sfarfallano con riserve di carboidrati (glicogeno) e lipidi (trigliceridi) dipendenti dalla dieta assunta nella fase larvale (Nayar 1968, 1969, Nayar and Sauerman, 1970). Nelle zanzare anautogeniche, queste riserve sono utilizzate per la sopravvivenza e per il volo, mentre nelle specie autogeniche servono anche per la maturazione del primo

ciclo di uova. Gli zuccheri servono ad aumentare la longevità e forniscono un'energia immediata per la dispersione. Nayar e Pierce (1977) hanno trovato che la percentuale di utilizzo di trigliceridi nelle prime 12-24 ore dopo lo sfarfallamento dipende dalla quantità presente allo sfarfallamento; le zanzare che presentano una maggiore quantità di trigliceridi hanno una percentuale di utilizzo minore rispetto a quelle che nascono con una riserva inferiore. Questo fenomeno è simile a quello che si ha quando alle zanzare viene offerto un pasto a base di zucchero da utilizzare per la sopravvivenza e la sintesi di riserve addizionali. Van Handel (1965) ha dimostrato che il tasso di esaurimento dello zucchero è proporzionale alla quantità presente all'interno del corpo della zanzara: quando la percentuale di zucchero supera una certa soglia, il suo esaurimento è molto più lento. Immediatamente dopo lo sfarfallamento, vengono avviati numerosi processi che richiedono notevoli quantità di energia.

E' generalmente accettato che, come altre zanzare, *Ae. aegypti* ed *Ae. albopictus* si nutrono di frutta, nettare dei fiori ed essudati vegetali per ottenere carboidrati utilizzati come fonte di energia sia per il volo che per altre richieste metaboliche (Foster, 1995; Briegel et al., 2001).

Nelle femmine l'alimentazione a base di zucchero aumenta il successo e la moltiplicazione di queste specie in quanto aumenta la produzione di uova (Nayar e Sauerman 1975, Gary and Foster, 2004, Zhou et al., 2004a, 2004b).

Con le prove qui presentate si sono volute ottenere informazioni sul comportamento alimentare dei maschi nelle 24 ore successive lo sfarfallamento e si sono volute comparare 2 fonti alimentari a base di zucchero e miele tenendo in considerazione convenienza, costi e risultati ottenuti.

Si è inoltre cercato di mettere a punto un contenitore di lancio in grado di fornire una fonte alimentare zuccherina e proteggere i maschi sterili nelle prime fasi dopo lo sfarfallamento.



### **2.2.1 Valutazione dell'effetto della somministrazione di sostanze zuccherine in allevamento**

Il presente studio è stato realizzato per valutare l'efficacia del miele come fonte energetica alternativa allo zucchero. I parametri analizzati per confrontare le due fonti alimentari sono stati:

- 1 – Longevità di maschi e femmine
- 2 – Fecondità (n ° uova / femmina)
- 3 – Fertilità delle uova (% di schiusura delle uova)

In 3 gabbie sono stati inseriti 50 femmine e 50 maschi di *Ae.albopictus* in ognuna, nutriti ogni due giorni con una soluzione di acqua distillata in una gabbia, con una soluzione al 10 % di zucchero nella seconda gabbia e con una soluzione al 10% di miele nella terza gabbia.

La longevità delle zanzare è stata controllata quotidianamente con la rimozione dalla gabbia di qualsiasi individuo morto, per 42 giorni dall'inizio della prova.

Cinque giorni dopo l'accoppiamento le zanzare sono stati nutrite con sangue e sono state contate le femmine che hanno svolto il pasto di sangue. Cinque giorni dopo il pasto di sangue sono state raccolte e contate le uova deposte.

La longevità di maschi e femmine è stata calcolata utilizzando le analisi di Kaplan-Meier.

Le uova raccolte sono state messe in acqua con brodo batterico per favorire la schiusura e le larve schiuse sono state conteggiate.

### **2.2.2 Prova di laboratorio 1 - Impiego di spugne con zucchero**

In 6 gabbie di allevamento (Fig. 2.4) sono state inserite, in ognuna, 200 pupe maschio setacciate a 30-40 h dall'impupamento all'interno di un vaso nero normalmente utilizzato per il lancio dei maschi sterili in campo.



Fig. 2.4 - Gabbia di plexiglass (40x40x40 cm) utilizzata per l'allevamento degli adulti

In 3 gabbie non è stata inserita nessuna fonte alimentare energetica (testimone - T), mentre in 3 gabbie è stata posta, all'interno dei vasi, una spugna di gommapiuma forata e impregnata con una soluzione di acqua e zucchero al 10%.

Dopo 2 giorni è stata tolta la spugna ed è stato immesso in tutte e 6 le gabbie uno strappo di carta bagnata.

### **2.2.3 Prova di laboratorio 2 - Densità di pupe**

In 2 gabbie di allevamento sono state immesse pupe maschio setacciate a 30-40 h dall'impupamento all'interno dei vasi di lancio. Nei vasi è stata immessa una spugna di gommapiuma impregnata di soluzione al 10% di zucchero e dopo 2 giorni è stata tolta la spugna. Nella gabbia S1 la densità di pupe è stata di 63,56 pupe/cm<sup>2</sup> mentre nella gabbia S2 la densità è stata di 70,37 pupe/cm<sup>2</sup>.

### 2.2.4 Prova di laboratorio 3 – Tipo di spugna

In 4 gabbie (3 con la spugna (S) e una testimone (T)) sono state immerse 200 pupe maschio, setacciate a 30-40 h dall'impupamento, all'interno dei vasi di lancio. Sono state testate 3 spugne di gommapiuma di diversa densità ( $S1=40 \text{ Kg/m}^3$ ;  $S2=30 \text{ Kg/m}^3$  e  $S3=21 \text{ Kg/m}^3$ ) impregnate con una soluzione al 10% di zucchero. Dopo due giorni sono state tolte le spugne e nelle 4 gabbie è stato immesso uno strappo di carta bagnato con acqua.

### 2.2.5 Prova di laboratorio 4 – Tempi di alimentazione dei maschi dopo lo sfarfallamento

Dopo aver verificato che le spugne non creavano problemi di mortalità e, di sfarfallamento dei maschi, si è cercato di valutare, nelle 24 ore successive allo sfarfallamento, il comportamento alimentare dei maschi.

Per verificare l'assunzione o meno di zuccheri è stata analizzata la presenza di fruttosio tal quale o legato al glucosio (come nel disaccaride saccarosio) nel corpo di ogni singolo maschio di *Ae.albopictus* utilizzando una tecnica analitica di tipo qualitativo basata sulla reazione colorimetrica tra Anthrone e fruttosio (Fig. 2.5).

Questo metodo, descritto per la prima volta da Van Handel nel 1972, è stato di recente utilizzato anche sui ragni (Taylor e Pfannenstiel, 2008) e su *Anopheles gambiae* (Impoinvil et al., 2004).

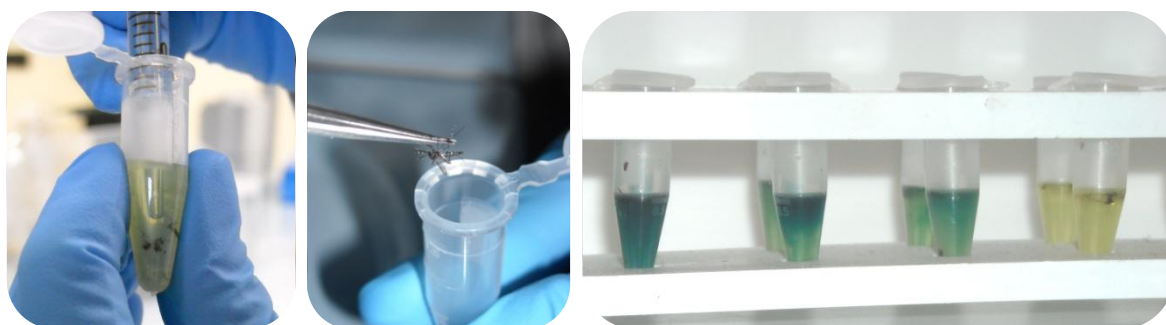


Fig. 2.5 - Test di Van Handel con Fructose Reagent

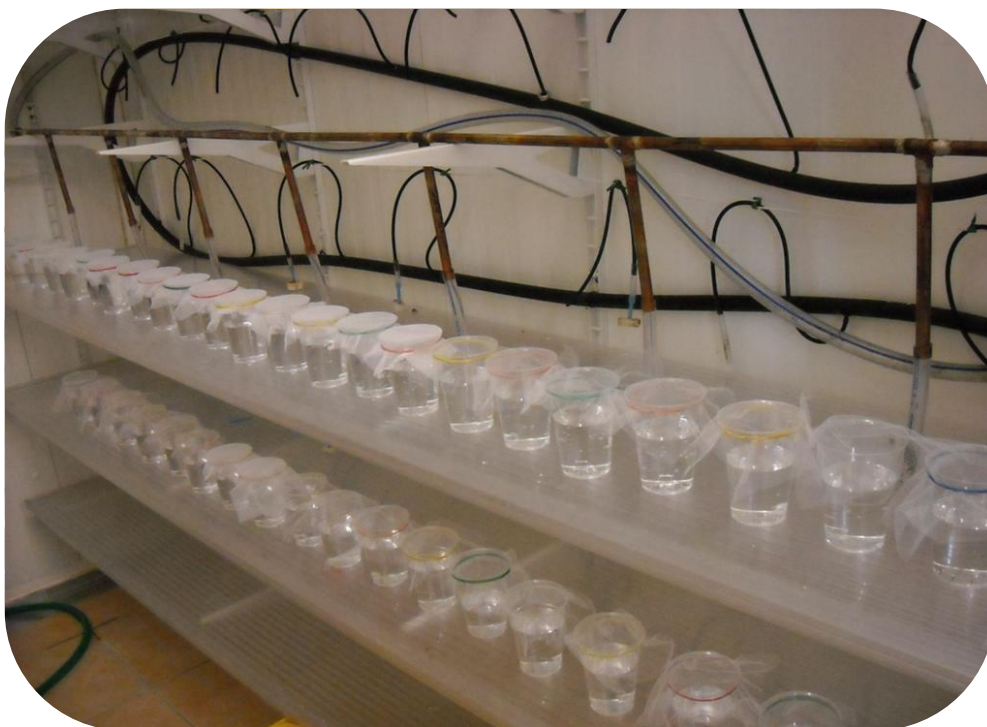


Fig. 2.6 - Prova sui tempi di alimentazione di maschi

In 50 bicchieri da 200 ml è stata immessa una pupa maschio setacciata a 30-40 h dall'impupamento. I bicchieri sono stati chiusi con una rete di tulle sopra alla quale è stato posto un batuffolo di cotone imbevuto di una soluzione al 10% di zucchero (Fig. 2.6). Gli adulti sfarfallati sono stati prelevati ogni ora, a partire dallo sfarfallamento, e messi in 0,5 cc di Fructose Reagent per verificare se si erano alimentati.

#### **2.2.6 Prova di laboratorio 5 - Efficacia delle spugne nell'alimentazione energetica dei maschi**

In 3 gabbie sono state immesse 100 pupe maschio setacciate a 30-40 h dall'impupamento. In 1 gabbia testimone (T) non è stata inserita nessuna fonte alimentare energetica, mentre nella altre 2 gabbie è stata posta, all'interno dei vasi, una spugna di gommapiuma forata e impregnata con una soluzione di acqua e zucchero al 10% a 2 cm dall'acqua. A partire da 2 ore dopo lo sfarfallamento, a intervalli di 1 ora, per

30 ore, tutti gli adulti presenti all'interno della gabbia sono stati prelevati e analizzati con Fructose Reagent per verificare se si erano alimentati.

### **2.2.7 Studio di semicampo in gabbie**

#### **Prova 1**

In 3 gabbie sono state introdotte 100 pupe maschio setacciate a 16-30 h all'interno di vasi di lancio con spugna per fiori in poliuretano espanso impregnata con una soluzione zuccherina al 10%. Nelle spugne è stato creato un foro centrale di 7,5 cm di diametro e 6,5 cm di profondità. Le pupe sono state immesse nell'incavo umido della spugna. Una gabbia è stata posta all'esterno al sole (dalle 13.00 alle 18.00), una all'esterno ma all'ombra (dalle 13.00 alle 18.00) e una in laboratorio.

#### **Prova 2**

In 4 gabbie poste all'aperto in area ombreggiata sono state immesse 100 pupe maschio all'interno di un vaso di lancio. Nella gabbia T1 non è stata inserita la spugna, nella gabbia T2 è stata inserita la spugna impregnata di solo acqua. Nella gabbia S5 è stata inserita una spugna impregnata con una soluzione zuccherina al 5%. Nella gabbia S10 è stata inserita una spugna impregnata con una soluzione zuccherina al 10%. Nelle spugne è stato creato un foro centrale di 7,5 cm di diametro e 6,5 cm di profondità. Un campione degli adulti sfarfallati è stato controllato con Fructose Reagent per verificare se si erano alimentati.

#### **Prova 3**

In 2 gabbie poste all'aperto in area ombreggiata sono state immesse 1000 pupe maschio all'interno di un vaso di lancio. Nella gabbia T1 non è stata inserita la spugna

mentre nella gabbia S10 è stata inserita una spugna per fiori alta 3,7 cm con 14 fori da 2,3 cm di diametro impregnata con una soluzione zuccherina al 10%. Un campione degli adulti sfarfallati è stato controllato con Fructose Reagent per verificare se si erano alimentati.

### 2.2.8 Studio di campo 1

Dalle prove di semicampo è emerso che circa la metà dei maschi neo-sfarfallati si nutre di soluzione zuccherina nelle 24 ore successive allo sfarfallamento.

Si è quindi pensato di inserire, nelle stazioni di lancio di maschi sterili in campo, il supporto utilizzato nelle prove di semicampo costituito da una spugna per fiori imbevuta di soluzione zuccherina.

La zona di lancio utilizzata per questo studio è stata Boschi di Baricella (16,4 ettari), dove sono state posizionate 10 stazioni di lancio disposte in modo omogeneo sul territorio, a una distanza di circa 100m una dall'altra (Fig. 2.7).

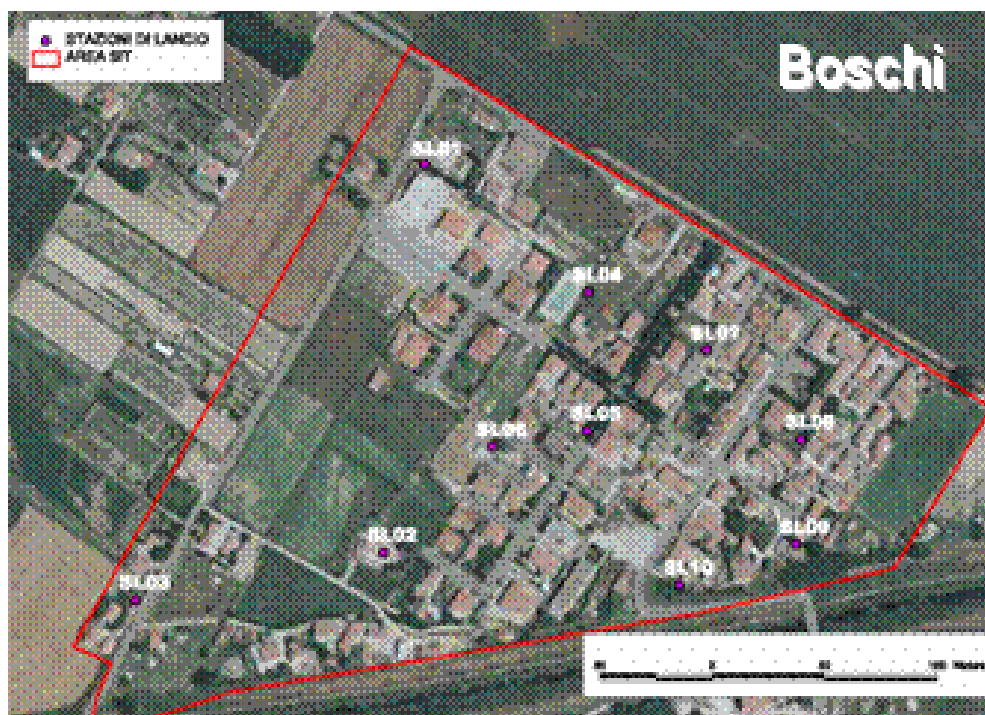


Fig. 2.7 - Area di studio a Boschi di Baricella

2 stazioni sono state utilizzate come testimone, lasciandole quindi prive di supporto, 4 sono state fornite di un supporto impregnato con una soluzione zuccherina al 10% e 4 di supporto impregnato con una soluzione zuccherina al 20% (Fig. 2.8).



Fig. 2.8 - Stazione di lancio

Nelle 24-48h successive al posizionamento delle pupe sterili in campo, sono stati eseguiti campionamenti di adulti nei pressi delle diverse stazioni di lancio utilizzando un aspiratore manuale.

Successivamente alla cattura, i maschi sono stati analizzati in laboratorio con Fructose Reagent per controllarne l'alimentazione.

In totale sono stati eseguiti 13 campionamenti, tra l'11 Giugno e l'8 Agosto, per un totale di 1455 adulti analizzati.



### 2.2.9 Studio di campo 2

La seconda prova di campo è stata realizzata nell'abitato di San Giorgio di Piano, in provincia di Bologna, dal 13 luglio al 26 settembre 2011. Sono state selezionate tre zone fisse (Fig. 2.9), a distanza di circa 400m una dall'altra, in cui venivano installate, con cadenza quindicinale, le stazioni di lancio realizzate utilizzando contenitori di plastica di colore verde scuro nei quali era stata inserita una spugna poliuretanica dello spessore di 5cm, provvista di 14 fori (diametro di 2,5 cm) attraverso i quali i maschi erano obbligati a passare durante lo sfarfallamento. Le spugne erano imbevute con acqua dechlorata nella stazione testimone (SL\_S) e di una soluzione composta di acqua dechlorata e saccarosio al 15% nelle altre due stazioni (SL\_FZ e SL\_SZ).

In ogni stazione di lancio sono state inserite circa 1000 pupe maschio fertili o sterili (30Gy) ogni 15 giorni secondo lo schema seguente:

SL\_FZ - Stazione 1 – Maschi fertili con supporto energetico;

SL\_SZ - Stazione 2 - Maschi sterili con supporto energetico;

SL\_S - Stazione 3 – Controllo: maschi sterili con spugna imbevuta di solo acqua dechlorata.



Fig. 2.9 - Stazioni di lancio a San Giorgio di Piano (BO)



Le pupe utilizzate provenivano dal ceppo di allevamento Rimini F47.

Ad ogni lancio, ogni stazione veniva spostata, in senso orario, in un'altra delle 2 postazioni in modo da annullare ogni effetto dovuto alla posizione.

Sono stati effettuati, in totale, 6 lanci per cui ogni stazione si è trovata due volte nella stessa posizione. I maschi sfarfallati sono stati ricatturati manualmente a 24 e 48 ore dal lancio utilizzando un aspiratore portatile alimentato da batteria a 12Volt.

Per verificare l'assunzione o meno di zuccheri nei maschi ricatturati è stata utilizzata la tecnica basata sulla reazione colorimetrica tra Anthrone e fruttosio.

Dopo ogni lancio, è stata controllata la mortalità all'interno di ogni stazione (calcolata come numero di pupe e numero di adulti morti nel vaso di lancio) per verificare il numero effettivo di pupe sfarfallate.

#### **2.2.10 Studio di semicampo in tunnel**

Ad Anzola dell'Emilia (BO), in un parco privato dove da diversi anni si conducono queste prove, sono stati predisposti 4 tunnel di dimensioni 8m x 5m x 2,8m realizzati con rete ombreggiante (Arrigoni scirocco black ®) montata e fissata su un'impalcatura metallica ad archi (Fig. 2.10).



Fig. 2.10 - Tunnel ad Anzola Emilia (BO)



Fig. 2.11 - Stazione di lancio con supporto energetico e imbuto

Con pupe irraggiate alla dose di 30 Gy (età pupe 24-30 h) si sono realizzate prove di competizione introducendo in tunnel 200 maschi fertili 200 maschi sterili e 100 femmine vergini provenienti da un ceppo raccolto in campo a Rimini e mantenuto in allevamento in condizioni standard per 47 generazioni.

Sono state svolte 2 prove, mettendo in competizione maschi sterili provvisti, nel vaso di lancio, di un supporto contenente soluzione zuccherina al 15% e maschi fertili senza supporto e, viceversa, maschi fertili con supporto e maschi sterili senza supporto. Le femmine vergini, in numero di 100 per ogni tunnel, sono state inserite a distanza di 3 e 6 giorni dal posizionamento delle pupe maschio.

Sul supporto impregnato di soluzione zuccherina è stato posizionato un imbuto bianco rovesciato (Fig. 2.11) per far sì che solo i maschi sfarfallati dal contenitore con supporto riuscissero ad alimentarsi mentre l'accesso ai maschi sfarfallati dal contenitore senza supporto fosse impedito dalla presenza dell'imbuto.

In Tab. 2.1 è rappresentato lo schema utilizzato durante le prove.

Una volta sfarfallati i maschi e tolti dai tunnel i vasi di lancio con i relativi supporti energetici, in ogni tunnel sono stati immessi 2 contenitori di plastica neri utilizzati come marcatori per favorire la formazione di sciame.

Tab. 2.1 - Schema utilizzato nelle prove in tunnel

PROVA 1

|                 |  |                             |
|-----------------|--|-----------------------------|
| <i>Tunnel 1</i> | 200 maschi fertili + 200 maschi sterili con zucchero | 100 femmine inserite a 3 gg |
| <i>Tunnel 2</i> | 200 maschi fertili con zucchero + 200 maschi fertili | 100 femmine inserite a 6 gg |
| <i>Tunnel 3</i> | 200 maschi fertili con zucchero + 200 maschi fertili | 100 femmine inserite a 3 gg |
| <i>Tunnel 4</i> | 200 maschi fertili + 200 maschi sterili con zucchero | 100 femmine inserite a 6 gg |

PROVA 2

|                 |  |                             |
|-----------------|--|-----------------------------|
| <i>Tunnel 1</i> | 200 maschi fertili + 200 maschi sterili con zucchero | 100 femmine inserite a 6 gg |
| <i>Tunnel 2</i> | 200 maschi fertili + 200 maschi sterili con zucchero | 100 femmine inserite a 3 gg |
| <i>Tunnel 3</i> | 200 maschi fertili con zucchero + 200 maschi fertili | 100 femmine inserite a 6 gg |
| <i>Tunnel 4</i> | 200 maschi fertili con zucchero + 200 maschi fertili | 100 femmine inserite a 3 gg |

A distanza di 2-3 giorni dal rilascio delle femmine nei tunnel, è stato fornito loro un pasto di sangue mediante tre volontari che sostavano all'interno dei tunnel per 10 minuti contando le femmine che pungevano, posizionando al contempo quattro ovitrappole con listelle di masonite per ciascun tunnel per la raccolta delle uova.

Le valutazioni dell'efficacia del supporto energetico sono state condotte verificando, mediante schiusura in laboratorio, il livello di fertilità delle uova deposte dalle femmine dopo l'accoppiamento.

## 2.3 Seconda prova di dispersione

La seconda prova di dispersione si è svolta negli abitati di Boschi e San Gabriele, due frazioni di Baricella, in provincia di Bologna, con l'obiettivo di stimare la densità dei maschi sterili rispetto ai maschi fertili selvatici di *Ae.albopictus* in una zona di lancio rispetto ad una zona testimone e valutare la dispersione e la densità in campo dei maschi irraggiati in funzione della distanza dalle stazioni di lancio.

Il 20 Luglio, il 24 Agosto e il 21 Settembre sono stati lanciati, nella frazione di Boschi, rispettivamente 10.000, 9.000 e 10.000 maschi irraggiati, ogni volta suddivisi in 4 stazioni di lancio fisse, provviste di spugna impregnata di soluzione zuccherina.

I maschi, provenienti da un ceppo di allevamento mantenuto in condizioni standard, sono stati alimentati, per il primo e il terzo lancio con una dieta (IAEA) composta da: 50% fegato di bovino, 50% farina di tonno e un supplemento (0,46%) di vitamin mix e per il secondo lancio da una dieta (CAA) composta da: 80% cibo secco per cani Friskies®, 14% lievito and 6% cibo per pesci Tetramin®.

A partire dal 1° giorno dopo il lancio, sono state condotte sessioni di cattura di maschi e femmine in parallelo nelle due località. In ogni località una squadra composta da due operatori catturava maschi e femmine nel periodo di maggiore attività di *Ae. albopictus*, dalle 16,30 alle 18,30, seguendo un percorso prestabilito che includeva 20 stazioni di campionamento georeferenziate scelte tra i siti più favorevoli alla presenza dei maschi. (Figg. 2.12 e 2.13).



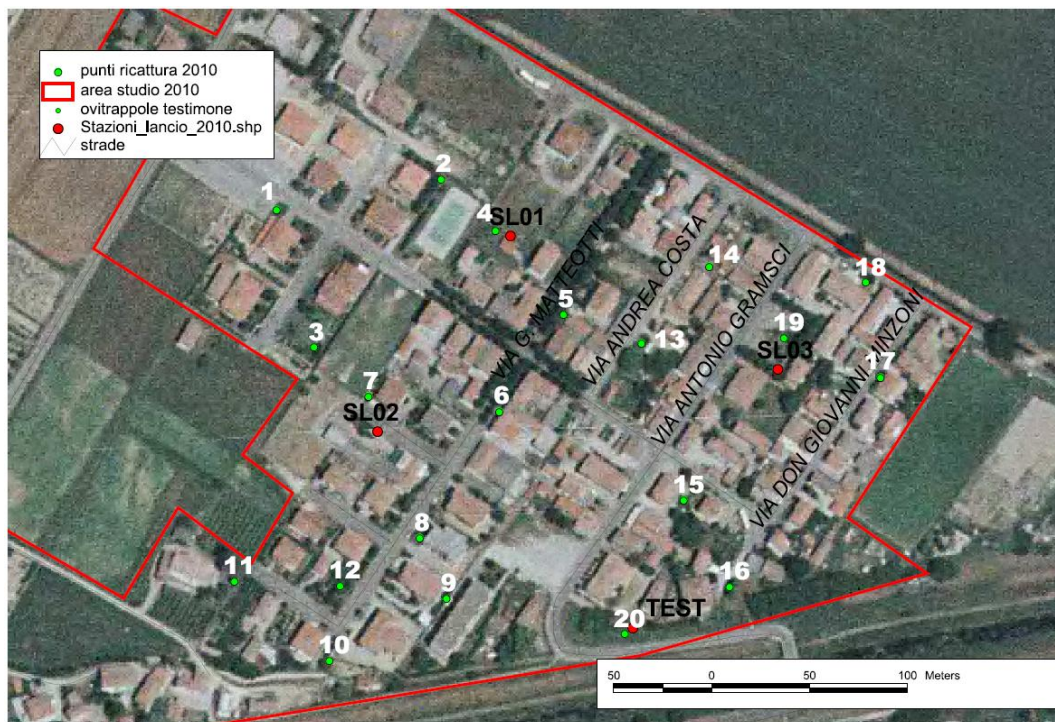


Fig. 2.12 - Punti ricattura Boschi (M sterili)

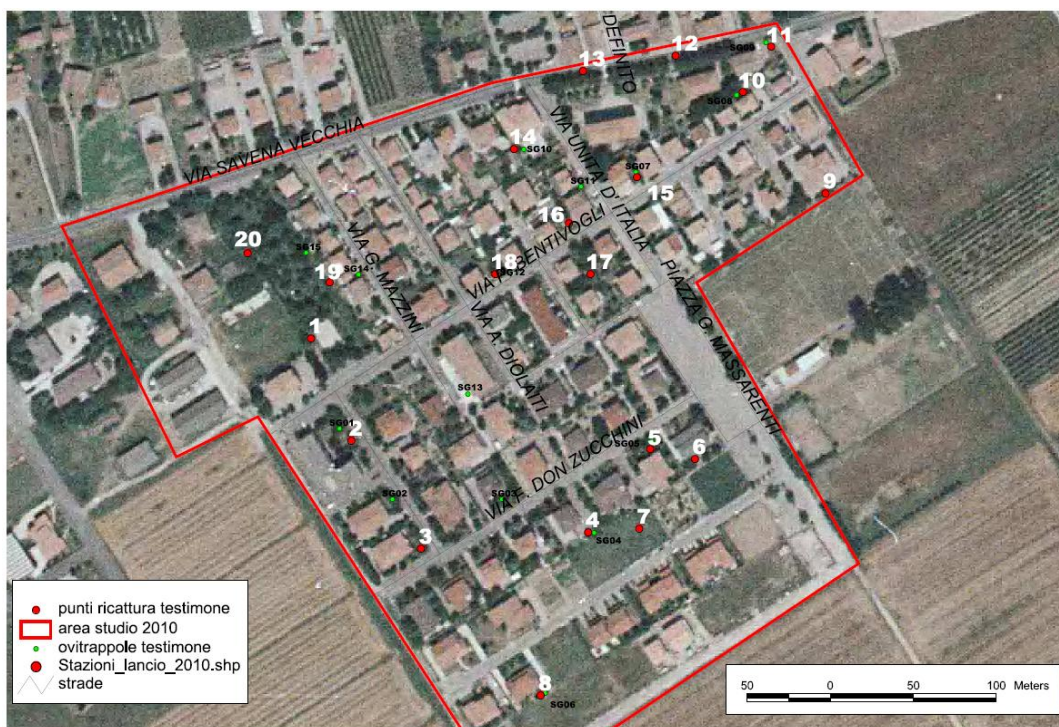


Fig. 2.13 - Punti ricattura S. Gabriele (M fertili)

In ogni punto di campionamento un tecnico svolgeva le catture su uomo con l'aspiratore manuale mentre l'altro contava il numero di sciami e li catturava con l'uso di un retino. La durata del campionamento era in ogni sito di 5 minuti.

I campionamenti venivano svolti con sequenza: 1°, 2°, 3°, 6°, 7° giorni dalla data di lancio.

Ogni sessione di campionamento è stata ripetuta una volta al mese per 3 mesi (Luglio, Agosto e Settembre) in modo da analizzare la sopravvivenza e la dispersione anche in funzione dei parametri climatici.

Per valutare il rapporto  $M_S/M_T$  (M sterili /M selvatici testimone) è stato utilizzato come riferimento il rapporto maschi/femmine corretto con quello registrato nell'area testimone, ipotizzando quindi che il rapporto maschi/femmine nelle popolazioni selvatiche non sia diverso nelle due località.

$$SS = (\beta/\alpha)$$

dove  $\beta = MS/FS$ , MS e FS sono rispettivamente il numero di maschi e femmine raccolti nell'area SIT mentre  $\alpha = MT/FT$ , MT e FT sono rispettivamente il numero di maschi e femmine raccolti nell'area testimone.

La densità dei maschi in campo è stata quindi misurata in modo indiretto con il rapporto  $M_S/M_T$ . I dati di sopravvivenza ricavati ci danno indicazione non tanto della sopravvivenza assoluta ma della variazione nel tempo del rapporto tra maschi sterili e maschi selvatici.

## **2.4 Prove di affinamento della metodica per la valutazione della competitività in fase di accoppiamento dei maschi in tunnel**

La fase di allevamento massale può determinare, nei ceppi allevati, una diminuzione della diversità genetica a causa di fenomeni di imbreeding (fenomeno che tende ad incrementare l'omozigosi su popolazioni a ridotto numero di individui, aumentando l'espressione di caratteri recessivi), con ripercussione sia sulla capacità riproduttiva sia sull'adattamento alle condizioni artificiali, con la conseguente perdita dei

genotipi più adatti alle condizioni di campo. Questi cambiamenti potrebbero determinare una riduzione delle performance dei maschi allevati quando saranno lanciati in natura (Asman et al., 1987; Coppel & Merlins, 1977). L'adattamento alle condizioni artificiali del laboratorio è in parte fisiologico, rappresentando la temporanea risposta della popolazione allevata al cambiamento delle condizioni ambientali, e in parte dovuto a variazioni genetiche ereditabili dalla progenie.

I tunnel possono essere una sorta di interfaccia tra l'ambiente artificiale del laboratorio e quello del campo, in modo da permettere uno studio che si avvicini il più possibile a quello che succede in natura, ma in grado di avere il controllo su determinate variabili, come il numero, i ceppi e le combinazioni degli insetti da esaminare.

Non ci sono, in bibliografia, informazioni disponibili riguardo a quali possono essere le migliori dimensioni dei tunnel e le quantità di insetti da utilizzare.

Numerose prove svolte negli scorsi anni da CAA mettendo in competizione maschi di allevamento con maschi di campo e maschi di allevamento con ceppi ibridi ottenuti in laboratorio facendo incrociare gli individui di ceppi provenienti da diverse zone d'Italia hanno mostrato che non ci sono differenze significative tra i vari ceppi utilizzati (Bellini et al., 2013).

Le varie prove condotte hanno però mostrato ampi livelli di variabilità legati a fattori difficilmente identificabili, ma che richiedono comunque la conduzione di numerose repliche per giungere a risultati consistenti.

Si è rivelato quindi necessario validare il protocollo per l'utilizzo dei tunnel come mezzo di studio della competitività dei maschi sterili di *Ae. albopictus* testando diverse densità di maschi sterili e fertili in competizione per le femmine vergini.

Ad Anzola dell'Emilia (BO), in un parco privato, per due anni consecutivi sono stati predisposti 4 tunnel di dimensioni 8m x 5m x 2,8m in modo da poter organizzare per ogni sessione di prova tre diversi trattamenti e un controllo. I maschi irraggiati a 30 Gy erano inseriti in tunnel insieme a un numero equivalente di maschi fertili per competere nell'accoppiamento con le femmine vergini. I tunnel di controllo, per verificare i livelli di fertilità di base nelle condizioni sperimentali testate, sono stati organizzati con combinazioni di maschi e femmine fertili dello stesso ceppo. In Tab. 2.2 e 2.3 sono rappresentati gli schemi utilizzati durante le prove nei 2 anni di studio.

Le diverse densità sono state testate a rotazione nei 4 tunnel in modo da evitare ogni possibile effetto dovuto alla posizione dei tunnel.

Tab. 2.2 - Schemi di competizione prove 2011

| <i>N° repliche</i> | <i>N° maschi<br/>irraggiati</i> | <i>N° maschi fertili</i> | <i>N° femmine</i> | <i>Rapporto competizione</i> |
|--------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------|------------------------------|
| 4                  | 100                             | 100                      | 100               | 1:1:1                        |
| 4                  | 200                             | 200                      | 100               | 2:2:1                        |
| 4                  | 300                             | 300                      | 100               | 3:3:1                        |
| 4                  | 0                               | 200                      | 100               | 2:1                          |

Tab. 2.3 - Schemi di competizione prove 2012

| <i>N° repliche</i> | <i>N° maschi<br/>irraggiati</i> | <i>N° maschi<br/>fertili</i> | <i>N°<br/>femmine</i> | <i>Rapporto<br/>competizione</i> |
|--------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 4                  | 33                              | 33                           | 100                   | 1:1:3                            |
| 4                  | 66                              | 66                           | 100                   | 1:1:1,5                          |
| 4                  | 100                             | 100                          | 100                   | 1:1:1                            |
| 4                  | 0                               | 100                          | 100                   | 1:1                              |

I maschi sono stati setacciati (Medici et al., 2000), irraggiati, a 24h dall'impupamento, con raggi gamma alla dose di 30 Gy e inseriti allo stato di pupa all'interno dei tunnel in contenitori di plastica con acqua insieme ai maschi fertili. Le femmine vergini, in numero di 100 per ogni tunnel, sono state inserite a distanza di 3 giorni dal posizionamento delle pupe maschio al fine di prevenire possibili effetti di vantaggio competitivo legato all'induzione di precocità da parte delle radiazioni (Bellini et al., 2013).

Giornalmente si è provveduto all'irrigazione dei tunnel per garantire sempre un adeguato livello di umidità relativa.

A distanza di 2-3 giorni dall'immissione delle femmine nei tunnel, è stato fornito loro un pasto di sangue mediante due volontari che sostavano all'interno dei tunnel per circa 10-15 minuti contando le femmine che effettuavano il pasto, posizionando al

contempo quattro ovitrappole con listelle di masonite per ciascun tunnel per la raccolta delle uova.

La competitività dei maschi sterili rispetto a quelli fertili è stata valutata confrontando la percentuale di uova schiuse nei tunnel testimone (solo maschi fertili) con la percentuale di uova schiuse nei tunnel competizione.

Dalla percentuale di uova schiuse è stato calcolato l'indice di competizione (IC):

$$IC = (PT - PC) / PC$$

dove PT è la percentuale di uova schiuse nel testimone e PC la percentuale di uova schiuse nei diversi trattamenti.



### 3. Risultati

#### 3.1 Prima prova di dispersione

La capacità di dispersione attiva dei maschi è stata valutata calcolando la Distanza Massima Percorsa (MAX), la Distanza Media Percorsa (MDT) e il Range di Volo (FR) (Lillie et al. 1981, White & Morris, 1985, Morris et al., 1991) per ogni sito di studio. La FR90 definisce, invece, la distanza dal sito di rilascio entro la quale si trova il 90% degli individui rilasciati. Analogamente, la FR50 si riferisce alla distanza dal sito di rilascio entro la quale si trova il 50% degli individui.

Al fine di valutare l'effettivo numero di maschi rilasciati, dopo 3 giorni sono stati contati, all'interno del vaso di lancio, le pupe e gli adulti morti. Sia per i maschi irraggiati che per i maschi fertili la mortalità è stata piuttosto bassa, rispettivamente 1,2% e 1,4%.

A Castel Maggiore sono stati ricatturati, in totale 585 maschi di cui 117 (20%) senza *Wolbachia*. A Castello d'Argile sono stati ricatturati, in totale, 432 maschi di cui 102 (24%) senza *Wolbachia* (Tab. 3.1-3.2).

Tab. 3.1 - Dati relativi alle catture dopo 3-5-7 giorni nel comune di Castel Maggiore (maschi fertili).

| <i>Castel Maggiore</i> | <i>Catture tot.</i> | <i>N° maschi APO</i> |
|------------------------|---------------------|----------------------|
| 3gg                    | 254                 | 51 (20,07%)          |
| 5gg                    | 170                 | 59 (34,70%)          |
| 7gg                    | 161                 | 7 (4,34%)            |
| Tot.                   | 585                 | 117 (20,00%)         |

Tab. 3.2 - Dati relativi alle catture dopo 3-5-7 giorni nel comune di Castello d'Argile (maschi sterili).

| <i>Castello d'Argile</i> | <i>Catture tot.</i> | <i>N° maschi APO</i> |
|--------------------------|---------------------|----------------------|
| 3gg                      | 87                  | 30 (34,48%)          |
| 5gg                      | 188                 | 33 (17,55%)          |
| 7gg                      | 157                 | 39 (24,84%)          |
| Tot.                     | 432                 | 102 (23,61%)         |

La percentuale di maschi ricatturati sul totale di quelli lanciati è stata quindi del 9,4% per i maschi fertili e dell'8,2 % per i maschi sterili.

In Tab. 3.3 sono riportati i dati relativi ai parametri di dispersione dei maschi nelle 2 località di lancio. I valori di dispersione registrati nei due Comuni mostrano un andamento simile, senza evidenti variazioni nella dispersione registrata tra il giorno 3 e il giorno 7 post-lancio. Si può però notare che nei primi 5 giorni dal lancio sono stati ricatturati più maschi fertili che maschi sterili, al contrario di quanto avviene a 7 giorni dal lancio (Tab. 3.1, Tab. 3.2, Fig. 3.1).

La modalità di dispersione può essere individuata dai dati relativi alla distanza media percorsa giornaliera (MDT). Qualora la dispersione avvenisse gradualmente a partire dal sito di rilascio, ci si aspetterebbe una relazione positiva tra MDT e tempo dal rilascio. Al contrario, un mancato aumento progressivo della dispersione durante il periodo post-rilascio, come da noi osservato a 3-5-7 giorni dopo il rilascio in tutti i siti studiati, sembra indicare che i maschi si disperdono quanto più possibile subito dopo che sono stati rilasciati (o almeno nei primi tre giorni nel nostro caso) e poi assumono un comportamento più statico nell'area di dispersione.

Tab. 3.3 - Dati relativi alla capacità di dispersione (valori in metri).

|                                 | <i>3 gg dal lancio</i> |        | <i>5 gg dal lancio</i> |        | <i>7 gg dal lancio</i> |        |
|---------------------------------|------------------------|--------|------------------------|--------|------------------------|--------|
| <i>Parametri di dispersione</i> | CM (Test)              | CA     | CM (Test)              | CA     | CM (Test)              | CA     |
| <i>MDT</i>                      | 173,76                 | 125,93 | 182,76                 | 188,61 | 173,24                 | 197,57 |
| <i>MAX</i>                      | 319,31                 | 284,82 | 424,94                 | 290,71 | 215,58                 | 307,36 |
| <i>FR50</i>                     | 151,98                 | 115,83 | 131,86                 | 166,77 | 161,75                 | 181,92 |
| <i>FR90</i>                     | 286,56                 | 230,57 | 354,39                 | 306,06 | 259,70                 | 280,94 |

MDT= Distanza media percorsa.

MAX= Distanza massima percorsa.

FR50= Range di volo relativo al 50% degli individui. FR90= Range di volo relativo al 90% degli individui.

CM= Castel Maggiore

CA= Castello d'Argile

I dati ottenuti, relativi alla capacità di dispersione attiva della specie, indicano 300-400 m come distanza ottimale tra diversi siti di rilascio in campo per una dispersione che risulti coprire l'intera area.

Durante la prova di dispersione, è stato osservato che la longevità dei maschi in campo è fortemente dipendente dalle condizioni climatiche (umidità relativa in particolare). Nei mesi estivi, caratterizzati da alte temperature e condizioni di siccità, i maschi rilasciati hanno scarse possibilità di reperire fonti energetiche indispensabili per la loro sopravvivenza e, di conseguenza, per la competizione con i maschi selvatici.

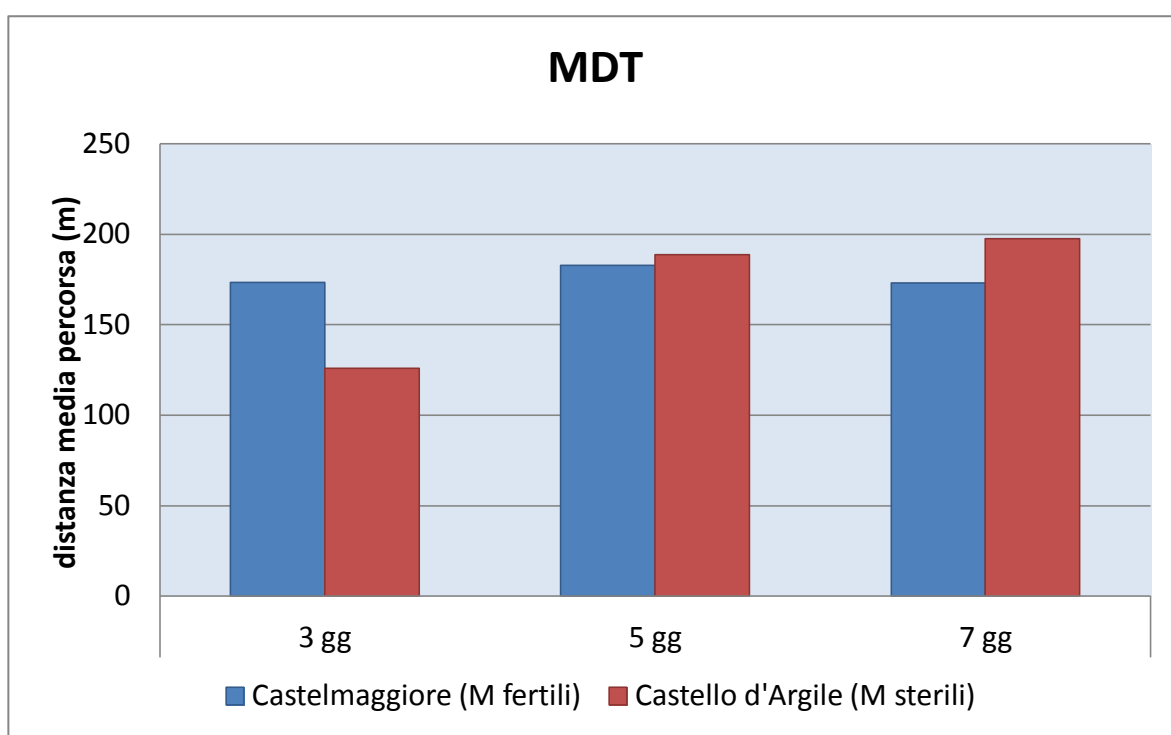


Fig. 3.1 - Confronto della distanza media percorsa (MDT) di maschi fertili (Castel Maggiore) e di maschi sterili (Castello d'Argile)

Si è quindi pensato di svolgere prove mirate alla ricerca e allo sviluppo di un dispositivo, da inserire nelle stazioni di lancio, in grado di fornire ai maschi sterili neofarfallati sostanze energetiche per aumentarne le possibilità di essere competitivi nei confronti dei maschi selvatici.

## 3.2 Prove di alimentazione maschi

### 3.2.1 Valutazione dell'effetto della somministrazione di sostanze zuccherine in allevamento

Le curve di longevità sono riportate nelle Figg. 3.2-3.3.

L'analisi statistica non ha mostrato differenze significative nella longevità dei maschi alimentati con zucchero e miele, anche se i maschi alimentati con lo zucchero vivono leggermente di più (Log Rank Test = 1,339917 e  $p = 0,18027$ ). Anche per la longevità delle femmine non si sono osservate differenze significative in funzione della fonte alimentare (Log Rank Test = 1,29487 e  $p = 0,19537$ ).

Non sono state osservate differenze significative nella fecondità (n° uova/femmina) tra le femmine nutrite con zucchero o con miele (Fig. 3.4), mentre le femmine alimentate con la soluzione di miele hanno complessivamente deposto di più rispetto a quelle nutrite con zucchero:  $F = 167,74$ ;  $p = 0,049$ .

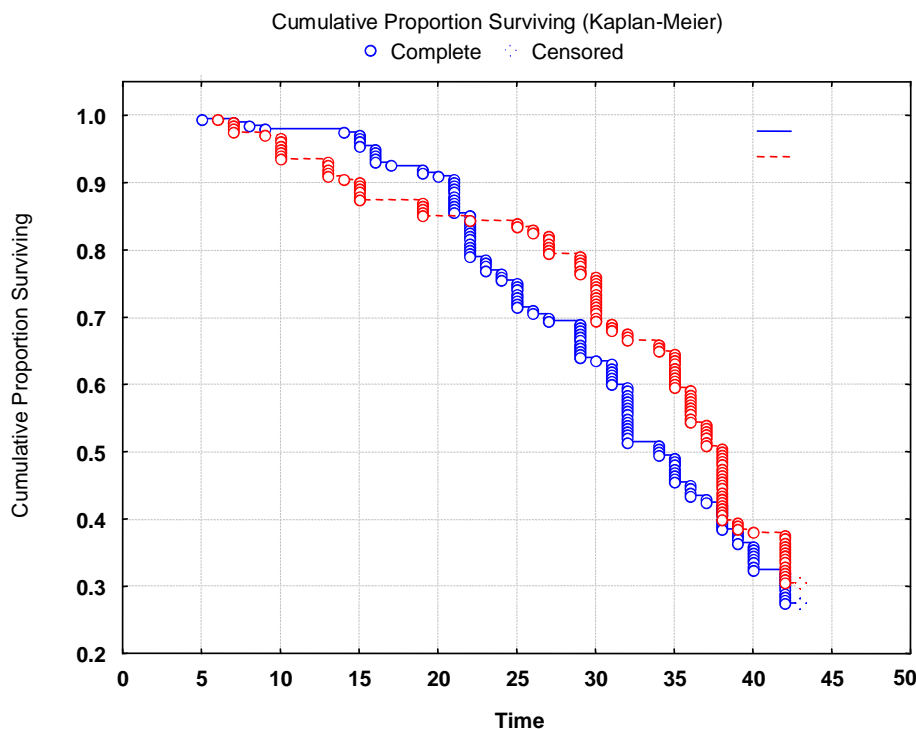


Fig. 3.2 - Longevità dei maschi

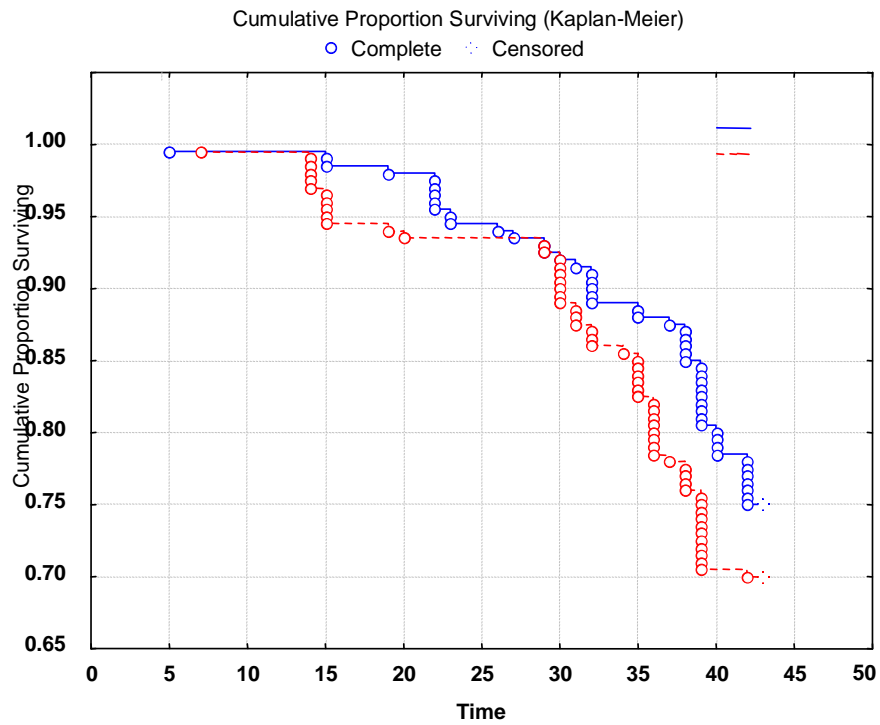


Fig. 3.3 - Longevità delle femmine

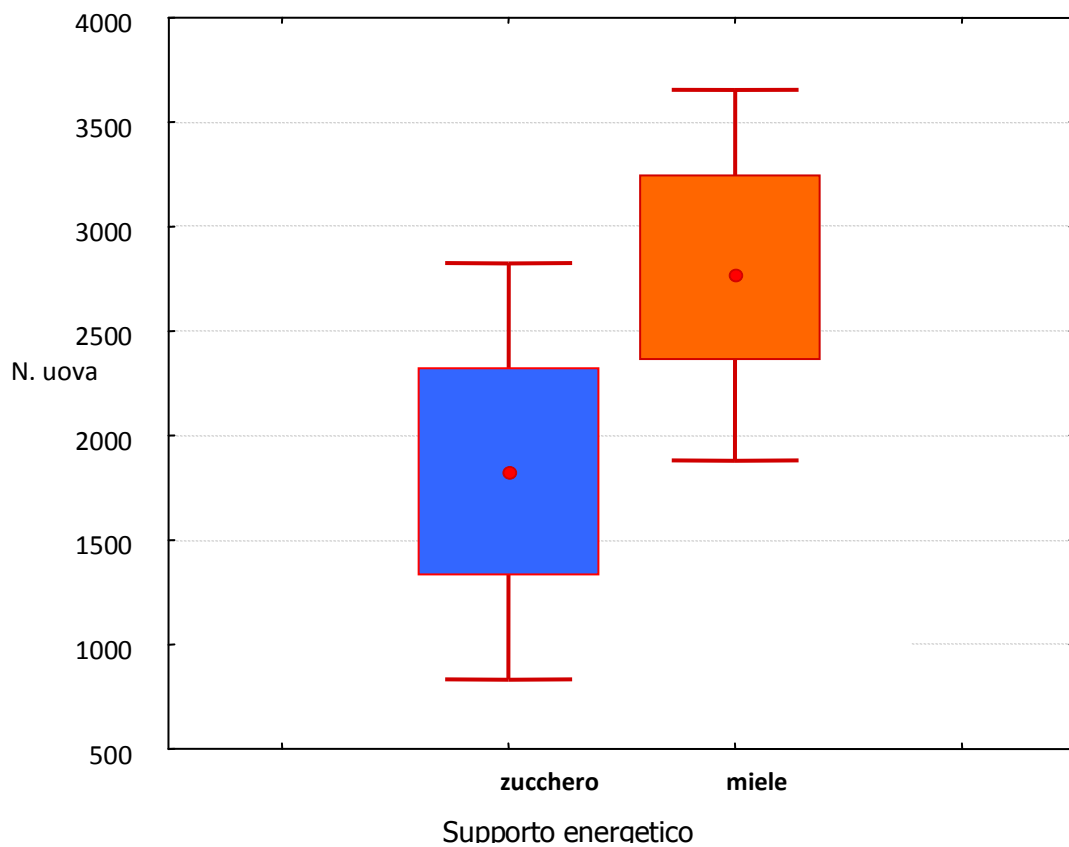


Fig. 3.4 - Fecondità delle femmine alimentate con zucchero e miele

Nessuna differenza significativa è stata trovata nella fertilità delle uova deposte dalle femmine alimentate con le due fonti energetiche ( $F = 22,35$ ,  $p = 0,13$ ).

I risultati ottenuti indicano che non ci sono differenze tra le 2 fonti alimentari se non nel numero complessivo di uova deposte, parametro di notevole importanza nell'ottica di un allevamento massale. Comparando però costi e risultati l'utilizzo del miele come fonte energetica non risulta conveniente quindi si è proceduto con le prove di alimentazione utilizzando, come supporto energetico, solo lo zucchero.

### 3.2.2 Prova di laboratorio 1 - Impiego di spugne con zucchero

Non si sono osservate differenze significative nel livello di sfarfallamento in presenza di spugna e zucchero e nel testimone (T-test  $t=1,38$  e  $p=0,24$ ).

Si osserva invece una maggiore longevità dei maschi (Fig. 3.5) in presenza della spugna con zucchero (sopravvivenza media  $7,58 \text{ gg} \pm 1,60 \text{ Ds}$ ) rispetto al testimone (sopravvivenza media  $6,30 \text{ gg} \pm 0,09 \text{ DS}$ ).

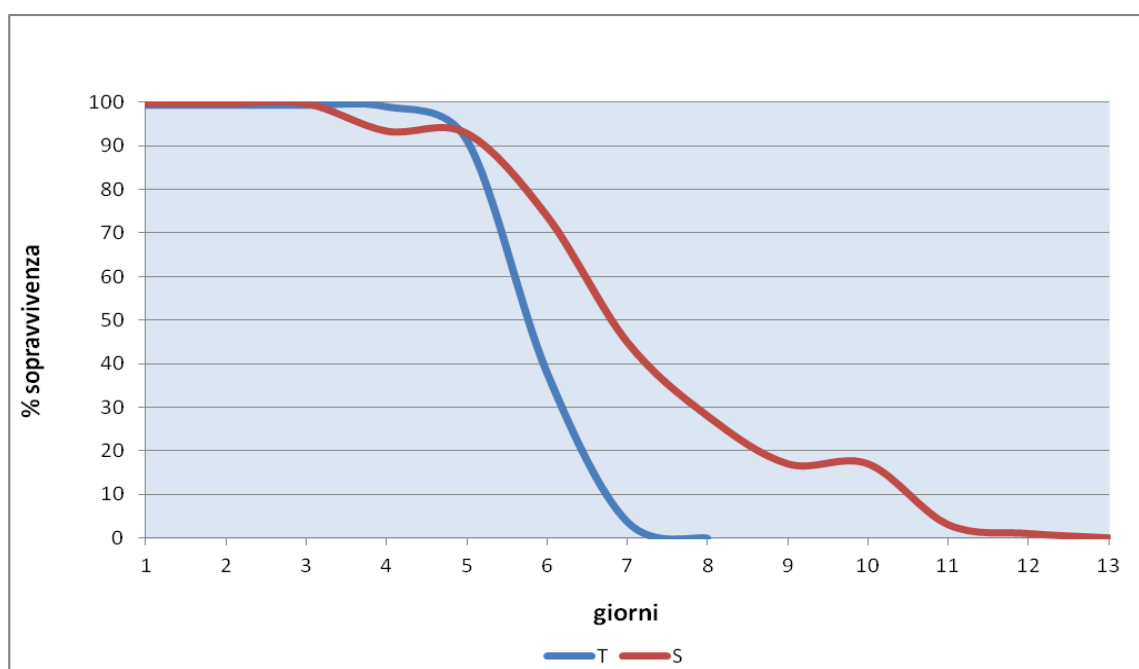


Fig. 3.5 - Sopravvivenza dei maschi in presenza di spugna (S) e nel testimone (T)

### 3.2.3 Prova di laboratorio 2 - Densità di pupe

In entrambe le gabbie la mortalità è risultata inferiore al 2% (Tab. 3.4).

Tab. 3.4 - Mortalità a diverse densità di pupe

| <i>Gabbia</i> | <i>Densità<br/>pupe/cm<sup>2</sup></i> | <i>n° pupe</i> | <i>Pupe morte</i> | <i>Adulti morti</i> | <i>%<br/>mortalità</i> |
|---------------|--|----------------|-------------------|---------------------|------------------------|
| S1            | 63,56                                  | 1555           | 13                | 12                  | 1,61                   |
| S2            | 70,37                                  | 1722           | 9                 | 12                  | 1,22                   |

### 3.2.4 Prova di laboratorio 3 – Tipo di spugna

Non si sono osservate differenze sostanziali tra i 3 tipi di spugna (Fig. 3.6) nella sopravvivenza dei maschi (T=7,23 giorni; S1=7,17 gg; S2=7,05gg; S3=7,22gg) anche se si è notato che le spugne a densità minore tendevano a rilasciare nell'acqua, col passare del tempo, la soluzione zuccherina di cui erano impregnate.

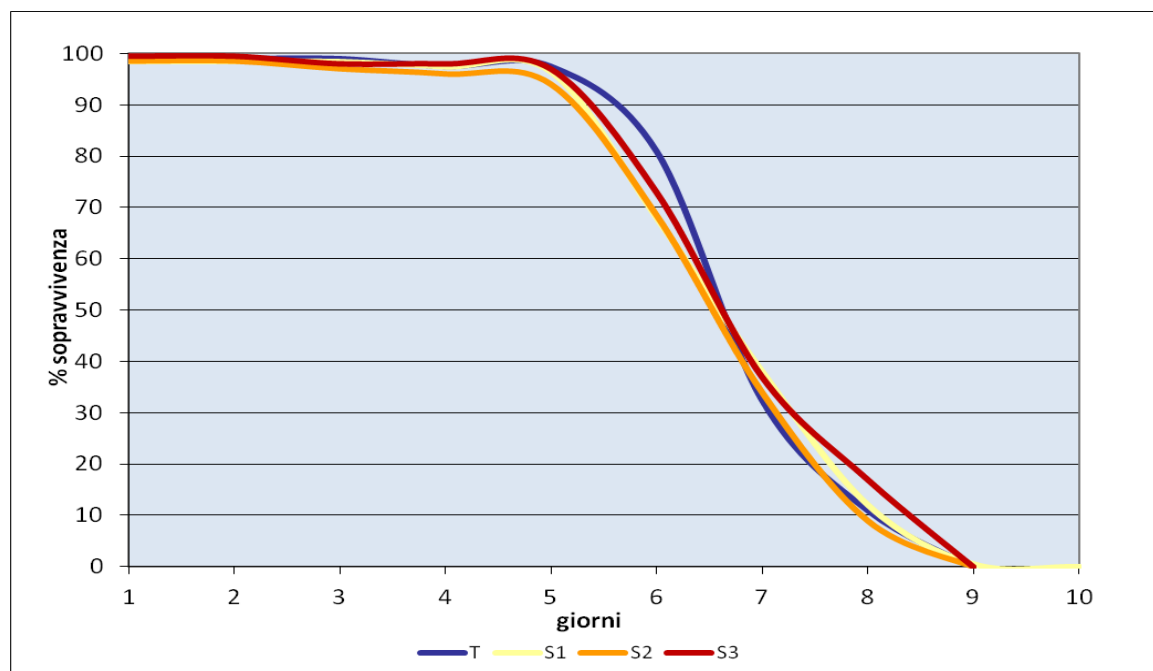


Fig. 3.6 - Sopravvivenza dei maschi coi tre tipi di spugna (S1, S2, S3) e nel testimone (T)

### 3.2.5 Prova di laboratorio 4 – Tempi di alimentazione dei maschi dopo lo sfarfallamento

Si è osservata una buona correlazione ( $R^2=0,88$ ) tra la percentuale di alimentazione e il tempo intercorso dallo sfarfallamento ( $Y= X0,0422+0,0742$  dove  $Y=$  % maschi alimentati e  $X=$  ore intercorse dallo sfarfallamento). Il T50 (tempo necessario per l'alimentazione del 50% dei maschi) è risultato essere di 10,09 ore mentre il T90 (90% dei maschi alimentati) è stato 19,57 ore.

### 3.2.6 Prova di laboratorio 5 - Efficacia delle spugne nell'alimentazione energetica dei maschi

La percentuale di maschi che si erano alimentati è stata dello 0% nel testimone e del 36,24% (DS = 5,63) nei maschi raccolti nelle gabbie con le spugne impregnate con la soluzione zuccherina (Fig. 3.7).

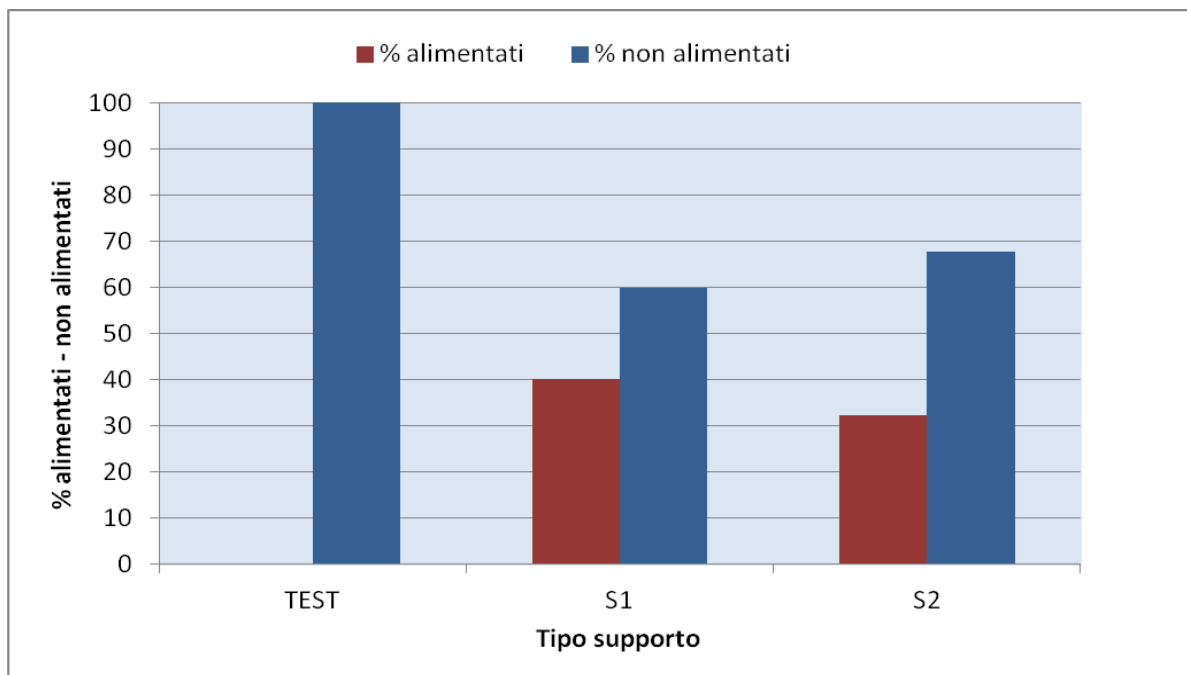


Fig. 3.7 - % di maschi alimentati con spugna (S1, S2) e nel testimone



### 3.2.7 Studio di semicampo in gabbie

#### Prova 1

Non si sono osservate differenze apprezzabili nello sfarfallamento dei maschi (93% gabbia al sole, 84 % gabbia all'ombra e 88% in laboratorio).

#### Prova 2

I dati hanno evidenziato una percentuale bassa di maschi alimentati con lo zucchero soprattutto in S5 (7,7 % maschi alimentati) rispetto a S10 (15,4 % di maschi alimentati) (Fig. 3.8).

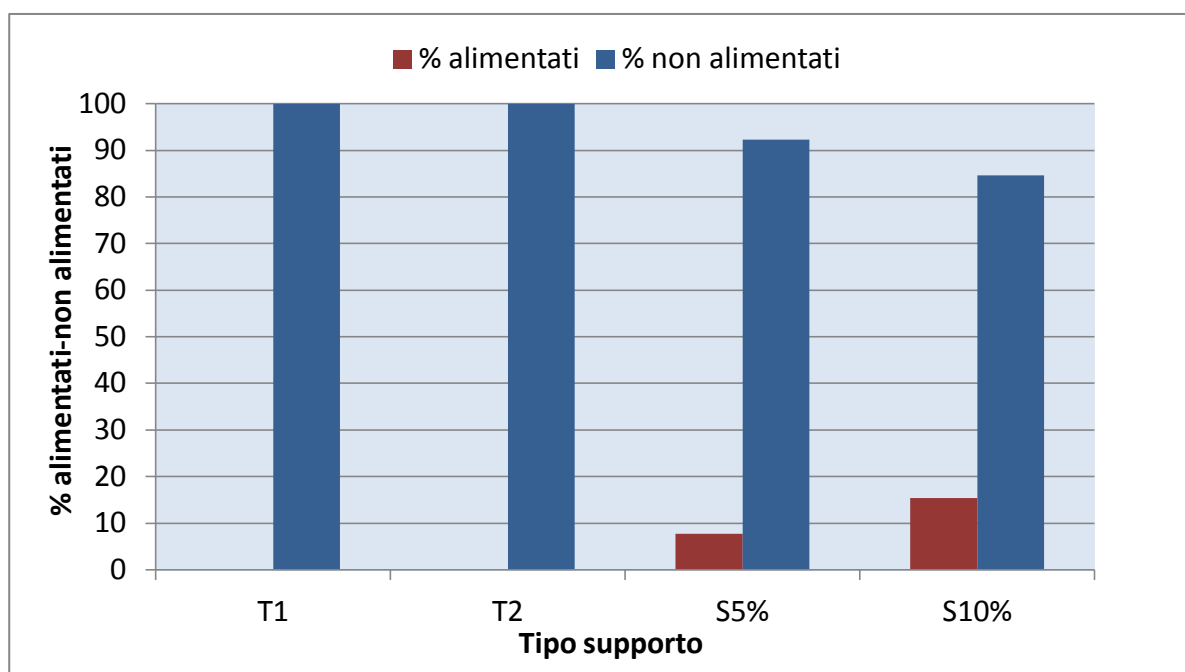


Fig. 3.8 - % di maschi alimentati a diverse concentrazioni di zucchero e nel testimone

### Prova 3

I dati hanno evidenziato una percentuale di maschi alimentati con lo zucchero in S10 pari al 46,19%, mentre nel testimone non sono stati rilevati maschi alimentati con zucchero (Fig. 3.9).

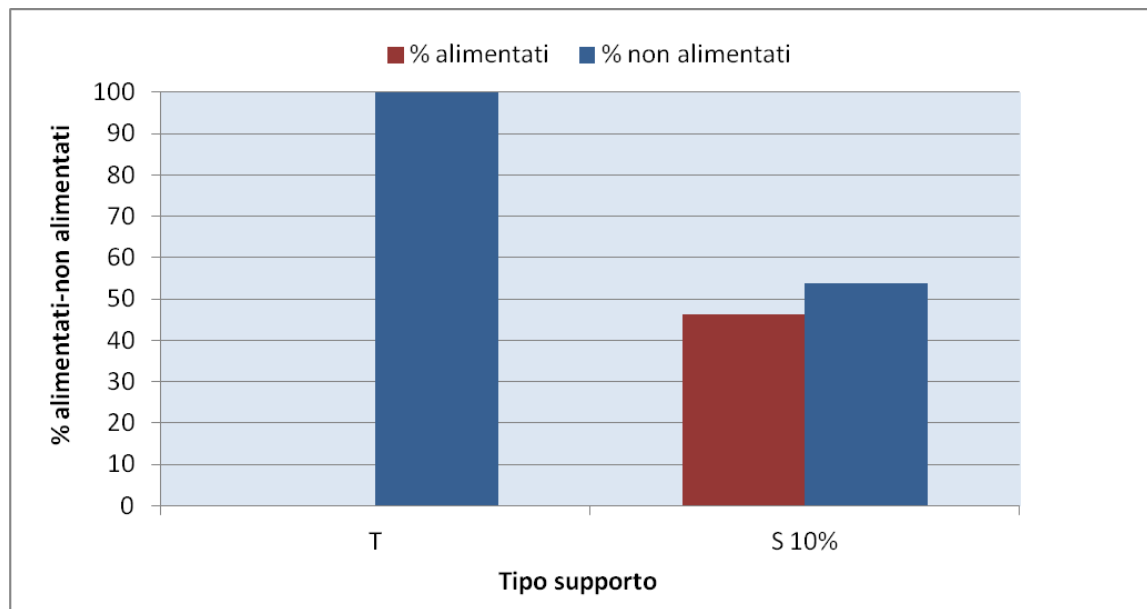


Fig. 3.9 - % di maschi alimentati con spugna impregnata e nel testimone

### 3.2.8 Studio di campo 1

E' stato osservato che, intorno alle stazioni fornite di supporto, circa il 42% dei maschi catturati è risultato positivo al test di Van Handel, rispetto al 12.6% dei maschi catturati intorno alle stazioni testimone.

Tra le concentrazioni 10 e 20% di zucchero non sono risultate differenze significative (Fig. 3.10).

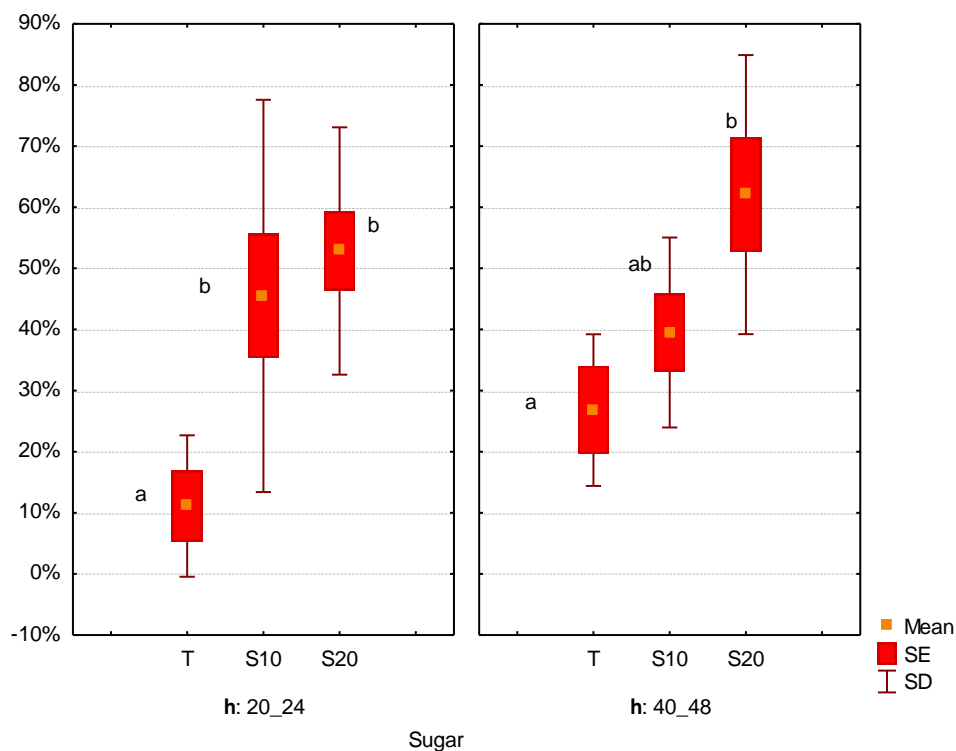


Fig. 3.10 - % di maschi alimentati intorno alle stazioni di lancio

### 3.2.9 Studio di campo 2

La mortalità è stata, in media, bassa in tutte le stazioni di lancio: 6,1% e 7,6% per i maschi fertili e sterili provvisti di supporto energetico e 6,4% per i maschi sterili provvisti solo di spugna con acqua dechlorata, senza differenze significative tra maschi sterili e maschi fertili.

Analizzando i dati dei maschi ricatturati a 24 ore dal lancio, non si notano differenze ( $F= 2,39$   $p=0,125$ ) tra le tre tesi testate: maschi sterili con zucchero, maschi fertili con zucchero e maschi sterili senza zucchero (controllo) (Fig. 3.11).

A 48 ore dal lancio si nota invece una differenza significativa ( $F=4,33$ ;  $p=0,033$ ) tra i maschi sfarfallati dalle stazioni provviste di supporto energetico e quelli sfarfallati dalle stazioni con solo acqua dechlorata (Fig. 3.12).

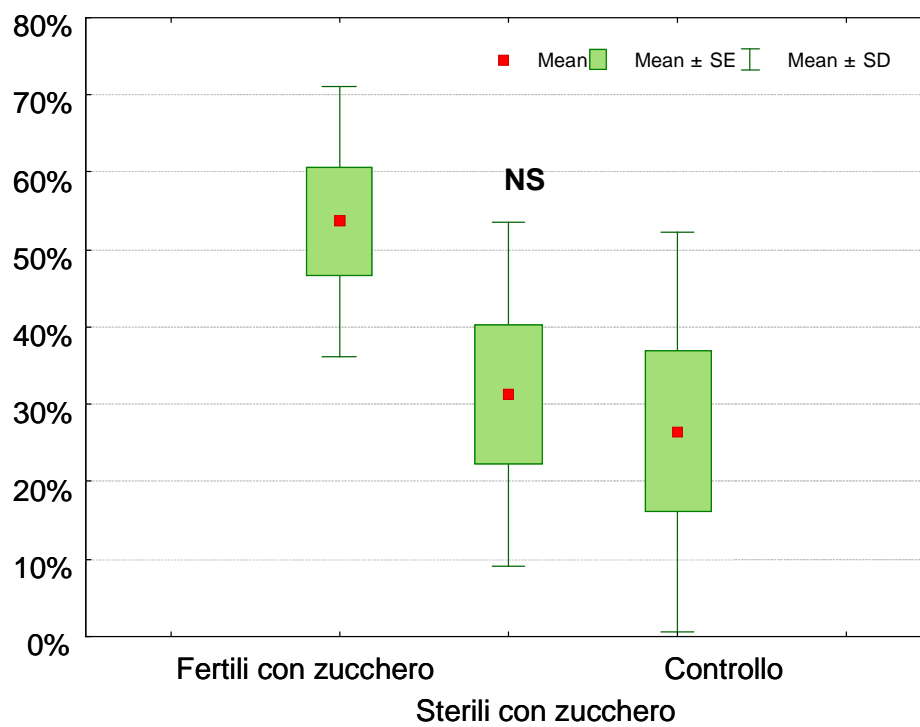


Fig. 3.11 - % maschi positivi all'Anthrone a 24h dal lancio

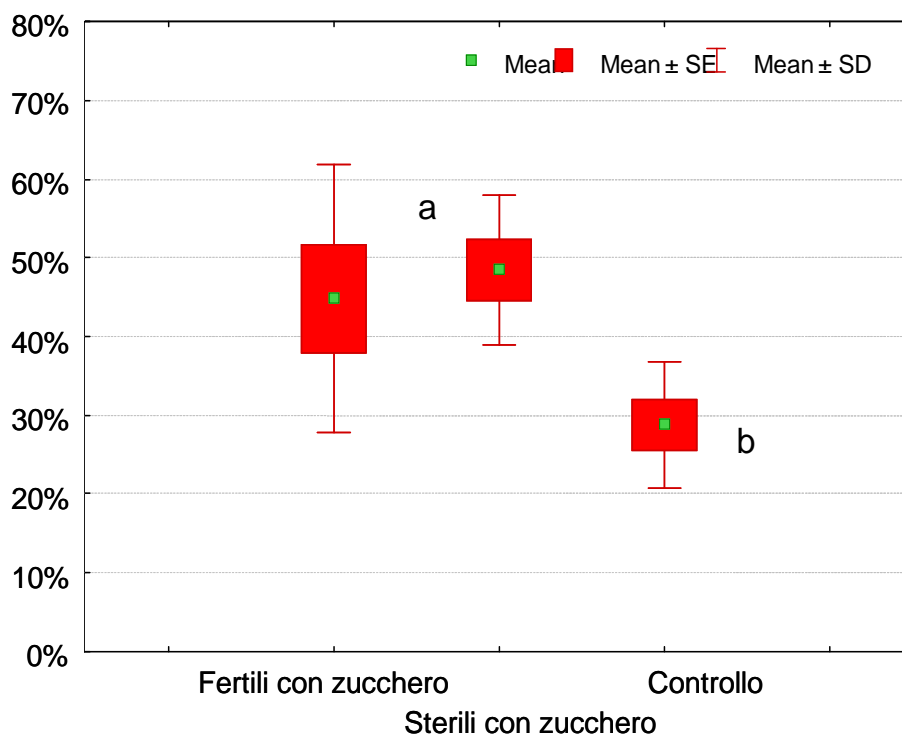


Fig. 3.12 - % maschi positivi all'Anthrone a 48h dal lancio

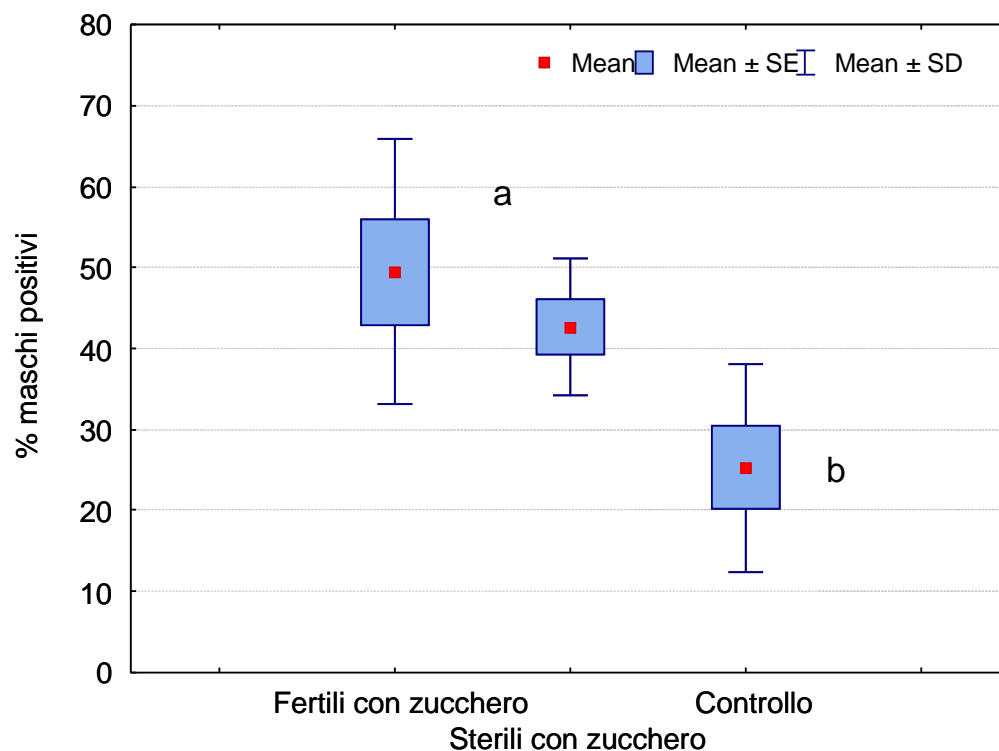


Fig. 3.13 - % maschi positivi all'Anthrone sul totale delle catture (24 + 48h)

Differenza significativa ( $F=5,57$ ;  $p=0,015$ ) si ha anche se si sommano i maschi risultati positivi nelle catture effettuate a 24 e 48 ore (Fig. 3.13). In Tab. 3.5 sono stati correlati i dati ottenuti in funzione dei valori di temperatura e umidità registrati dalla stazione Arpa di San Pietro Capofiume, Comune di Molinella (BO) durante la prova.

I risultati indicano che i maschi senza supporto energetico tendono ad alimentarsi di più quando l'umidità relativa aumenta mentre per i maschi provvisti di supporto energetico non c'è correlazione con umidità relativa e temperatura. Probabilmente sia la  $T$  ( $r=-0,71$ ) che l' $RH$  ( $r=0,89$ ) influenzano molto di più l'alimentazione dei maschi quando non sono presenti le spugne.

Se invece si verifica l'effetto dell'alimentazione degli sterili con zucchero correggendo i dati con il testimone (sterili senza zucchero), si nota un effetto evidente negativo della  $RH$  e positivo della  $T$  (Tab. 3.6).

Tab. 3.5 – Correlazione con temperatura e umidità relativa

|                            | <i>Maschi fertili con<br/>zucchero</i> | <i>Maschi sterili con<br/>zucchero</i> | <i>Maschi sterili senza<br/>zucchero</i> |
|----------------------------|--|--|--|
| <b><i>RH media %</i></b>   | r= 0,35<br>p= 0,497                    | r= 0,49<br>p= 0,319                    | <b>r= 0,89</b><br><b>p= 0,016</b>        |
| <b><i>T media (°C)</i></b> | r= 0,19<br>p= 0,721                    | r= 0,17<br>p= 0,747                    | r= - 0,71<br>p= 0,113                    |

Tab. 3.6 – Correlazione con temperatura e umidità relativa

| <b><i>Ratio % maschi con zucchero</i></b>            | <b><i>RH media</i></b> | <b><i>T media</i></b>               |
|--|------------------------|-------------------------------------|
| <i>Sterili + zuccheri/sterili<br/>senza zucchero</i> | r= 0,8846<br>p= 0,019  | <b>r= 0,8534</b><br><b>p= 0,031</b> |
| <i>Fertili + zucchero/Sterili +<br/>zucchero</i>     | r= 0,0652<br>p= 0,902  | r= - 0,2805<br>p= 0,590             |

Questo significa che la fonte alimentare fa sì che i maschi alimentati con zucchero nelle aree di lancio con fonte alimentare siano oltre 4 volte in più rispetto al testimone quando l’RH è intorno al 40% mentre se l’RH è alta la fonte alimentare sembra incidere poco perché probabilmente in natura sono presenti fonti alimentari sufficienti (Fig. 3.14).

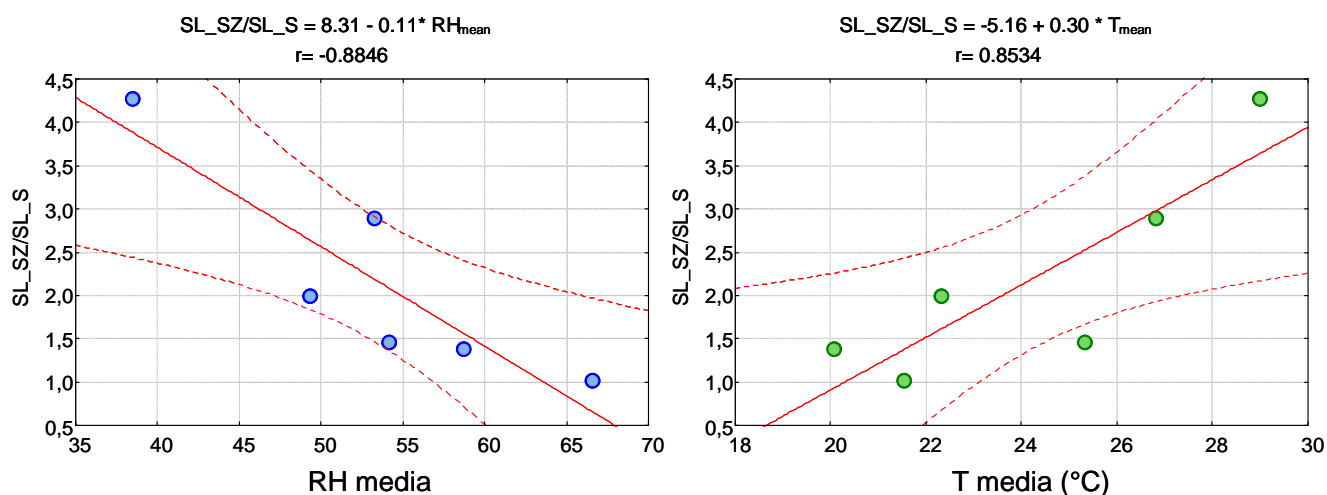


Fig. 3.14 - % Effetto di RH e T sull'alimentazione dei maschi

Lo stesso discorso si può fare per quanto riguarda la temperatura: quando la media giornaliera è intorno a 29°C i maschi con zucchero sono oltre 4 volte di più dove sono presenti le spugne.

In conclusione, si può dire che in primavera probabilmente la fonte alimentare supplementare si rivela inutile in quanto in natura i maschi riescono a reperire altre fonti alimentari; in estate, invece, può essere un aiuto importante.

### 3.2.10 Studio di semicampo in tunnel

Dalla verifica della schiusura delle uova deposte, si è potuto dimostrare che lo zucchero influisce in modo positivo sui maschi che se ne nutrono, sia fertili che sterili, fornendogli un supporto che li rende più competitivi. Quando i maschi fertili sono stati provvisti di supporto energetico, la schiusura media delle uova è stata del 53,5%, mostrando quindi un vantaggio dei fertili sugli sterili; quando il supporto energetico è stato fornito ai maschi sterili, la schiusura media è stata del 40,3%, mostrando, in questo caso, la superiorità dei maschi sterili.

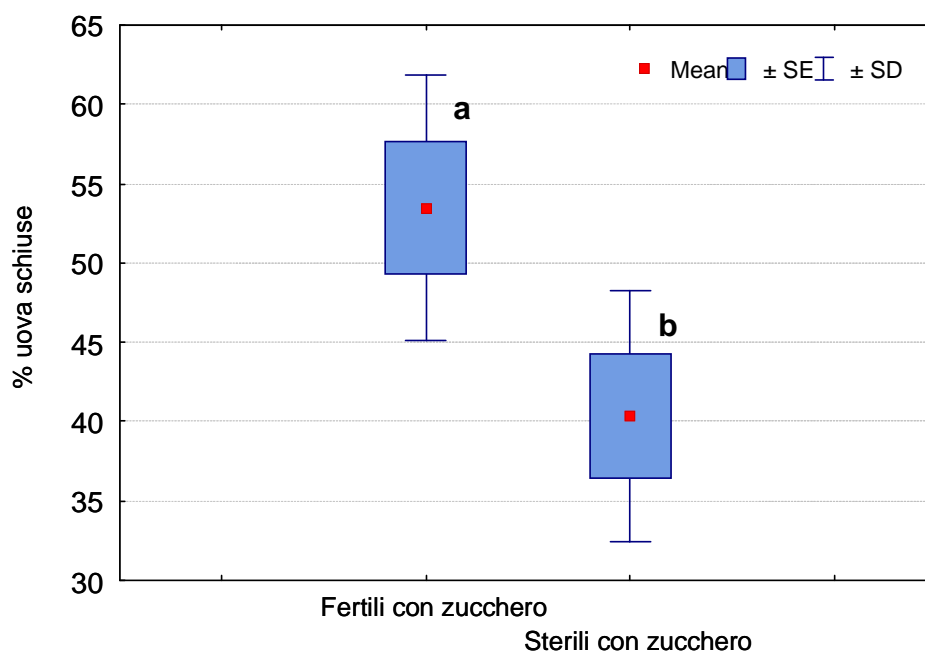


Fig. 3.15 - Effetto dello zucchero fornito ai maschi sulla % di fertilità delle uova deposte

L'analisi dei dati a blocchi (fertili/sterili e giorno di somministrazione zucchero) ha mostrato una differenza significativa ( $F= 251,15$ ;  $p=0,040$ ) tra fertili e sterili forniti di supporto energetico (Fig. 3.15).

L'analisi della schiusura delle uova è stata effettuata anche mettendo a confronto i dati ottenuti dalla competizione tra fertili con zucchero e sterili con zucchero immettendo nei tunnel le femmine a 3 e 6 giorni di distanza dal posizionamento dei maschi.

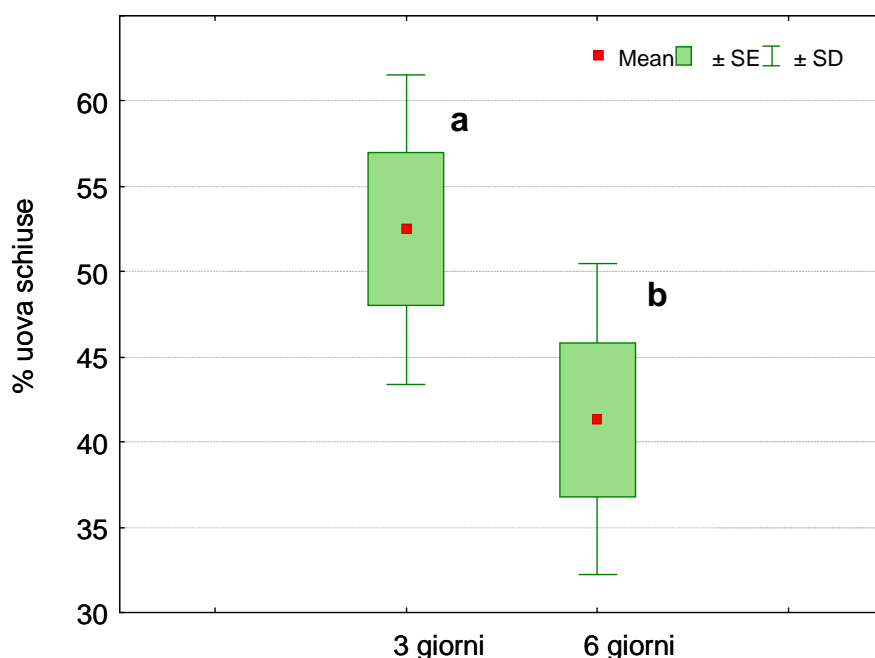


Fig. 3.16 - Fertilità delle uova deposte in funzione del giorno di somministrazione dello zucchero

Analizzando i dati per blocchi (giorno di somministrazione zucchero e fertili/sterili) si osservano differenze significative ( $F=182,49$  e  $P=0,047$ ) in funzione del giorno di somministrazione dello zucchero (Fig. 3.16). Togliendo il supporto energetico subito dopo lo sfarfallamento, ci si aspettava che l'effetto della fonte energetica diminuisse con il tempo, quindi quando le femmine venivano rilasciate dopo 6 giorni.

Questo, in effetti, si è verificato per i maschi fertili: quando messi in competizione con gli sterili senza zucchero, si sono dimostrati più competitivi nei primi giorni rispetto a quando le femmine sono state inserite dopo 6 giorni (Fig. 3.17).



Per quanto riguarda i maschi sterili, invece, non si è avuto il risultato atteso in quanto, sia quando le femmine sono state immesse a 3 giorni che a 6 giorni, si sono mostrati più competitivi di quelli fertili senza zucchero (Fig. 3.17).

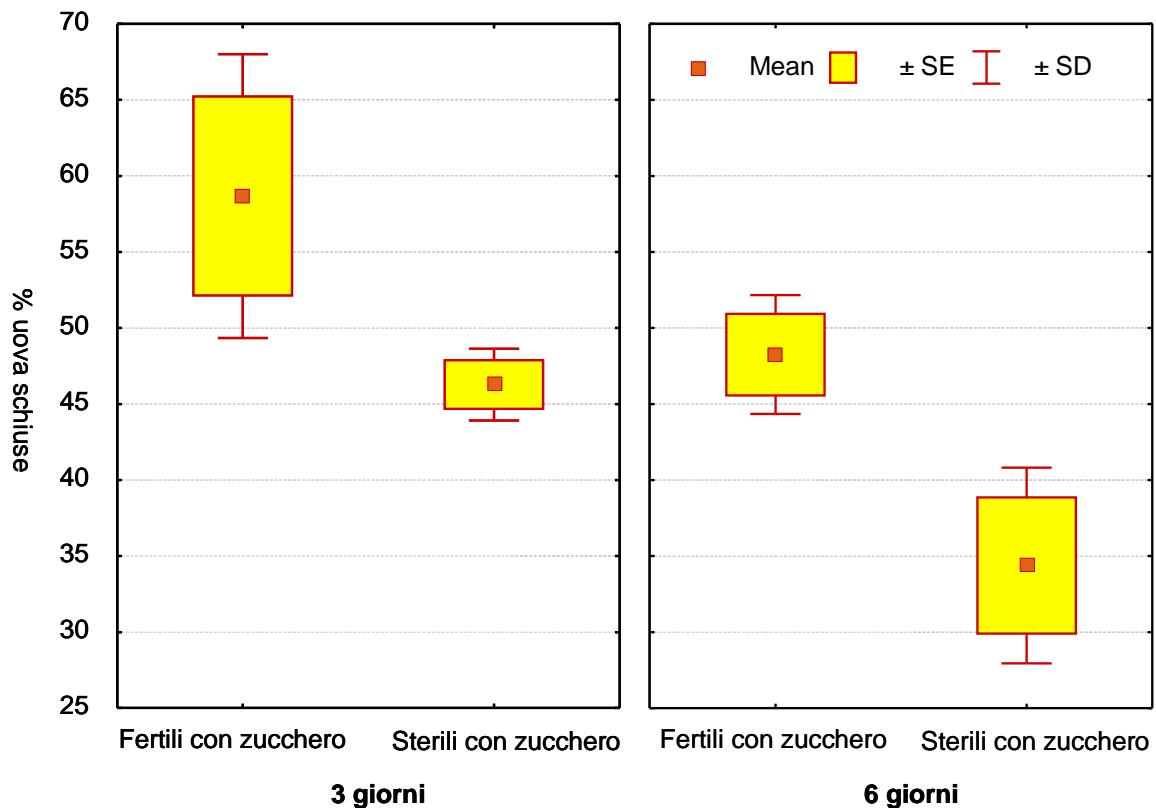


Fig. 3.17 - Effetto dello zucchero fornito ai maschi sulla % di fertilità delle uova deposte dalle femmine inserite nei tunnel dopo 3 e 6 giorni

### 3.3 Seconda prova di dispersione

In Fig. 3.18 è riportato l'andamento registrato nelle tre sessioni di cattura realizzate nei mesi di Luglio, Agosto e Settembre.

Il primo e il terzo lancio mostrano un andamento simile, con un lieve incremento del rapporto tra zona di lancio e zona testimone soprattutto verso il 6° e il 7° giorno post-rilascio.

Nella seconda prova si notano invece valori di rapporto SS più elevati con un picco di catture il terzo giorno post-rilascio e un successivo calo il 6° e 7° giorno.

La differenza osservata tra la seconda prova e le altre 2 può essere imputabile alla diversa dieta utilizzata nell'allevamento dei maschi lanciati. Il numero dei maschi ricatturati alimentati con dieta CAA nei primi 3 giorni post-rilascio è stato nettamente superiore a quello dei maschi alimentati con dieta IAEA. Anche in prove realizzate in laboratorio (A. Puggioli, tesi di dottorato) la dieta CAA mostra una percentuale di sopravvivenza dei maschi in gabbia maggiore rispetto alla dieta IAEA. Al 6 giorno i maschi alimentati con dieta CAA mostrano però un netto calo mentre quelli IAEA sembrano in leggero incremento.

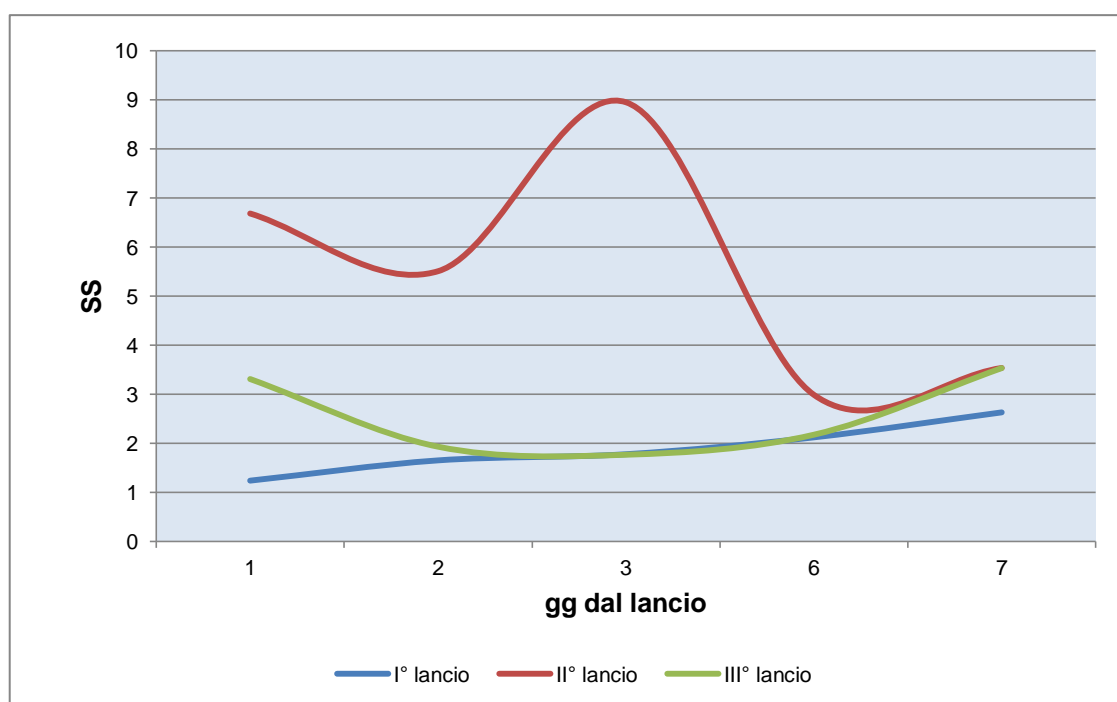


Fig. 3.18 - Rapporto  $M_S/M_T$  registrato nei tre lanci

Per tutto il periodo di svolgimento delle prove sono stati annotati anche i valori di temperatura, di precipitazione e di umidità relativa (Fig. 3.19) registrati dalla stazione più vicina del Servizio Meteorologico Regionale ARPA di Mezzolara, Budrio (BO).

Analizzando i dati in funzione dei parametri climatici, si può notare come, nel periodo precedente il secondo lancio, i valori di umidità relativa e precipitazioni siano stati più elevati rispetto ai periodi precedenti gli altri 2 lanci.

Anche questo potrebbe aver portato condizioni più favorevoli alla sopravvivenza dei maschi in campo. I risultati ottenuti mostrano quindi una certa complessità interpretativa che richiede ulteriori repliche ed analisi comparate tra diversi ambienti e periodi stagionali.

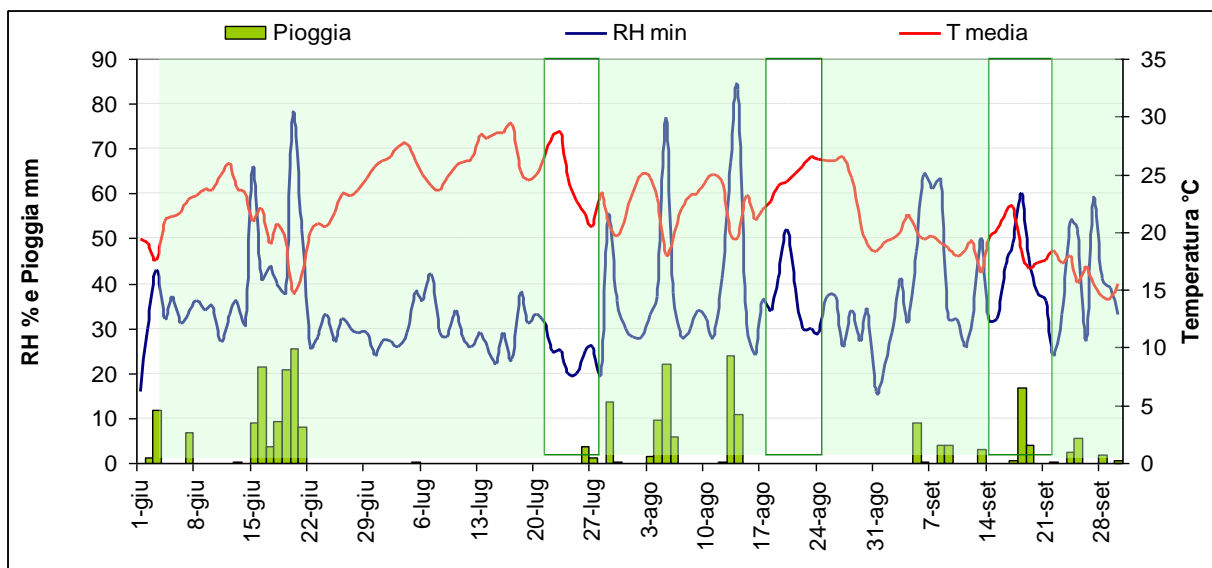


Fig. 3.19 - Andamento di umidità relativa, temperatura e precipitazioni nella stazione ARPA di Mezzolara, (Budrio, BO)

### 3.4 Prove di affinamento della metodica per la valutazione della competitività in fase di accoppiamento dei maschi in tunnel

In Tab. 3.7 e 3.8 sono riportati i dati ottenuti nei due anni di studio riguardo la fecondità (n° uova femmina), la % di schiusura e la capacità di indurre sterilità (indice di competizione).

Quando l'IC è uguale a 1 significa che i maschi sterili sono competitivi quanto i fertili. Se l'IC è maggiore di 1 i maschi sterili sono più competitivi dei fertili e viceversa.

La fecondità media nei tunnel di competizione è stata di  $40,40 \pm 15,33$  uova/femmina nel 2011 (con un min di 27,90 e un max di 76,19), mentre nel controllo è stata di  $61,65 \pm 9,52$  (min. 24,24; max 141,50). Nel 2012 la fecondità media nei tunnel di

competizione è stata di  $52,27 \pm 20,52$  (con un minimo di 31,50 e un massimo di 97,20) e del  $47,93 \pm 13,67$  (min. 30,94; max 64,33) nei tunnel di controllo.

Tab. 3.7 - Fecondità, fertilità residua e IC nelle prove in tunnel 2011

| <i>Trattamento</i> | <i>n° repliche</i> | <i>media uova/femmina</i> | <i>% uova schiuse</i> | <i>IC</i> |
|--------------------|--------------------|---------------------------|-----------------------|-----------|
| Controllo          | 4                  | $61,65 \pm 9,52$          | $89,28 \pm 54,93$     | -         |
| 100:100            | 4                  | $54,14 \pm 7,81$          | $48,48 \pm 18,89$     | 0,84      |
| 200:200            | 4                  | $36,87 \pm 10,17$         | $40,26 \pm 9,64$      | 1,22      |
| 300:300            | 4                  | $30,19 \pm 12,42$         | $53,18 \pm 2,23$      | 0,68      |

Tab. 3.8 - Fecondità, fertilità residua e IC nelle prove in tunnel 2012

| <i>Trattamento</i> | <i>n° repliche</i> | <i>media uova/femmina</i> | <i>% uova schiuse</i> | <i>IC</i> |
|--------------------|--------------------|---------------------------|-----------------------|-----------|
| Controllo          | 4                  | $47,93 \pm 13,67$         | $91,83 \pm 4,61$      | -         |
| 33:33              | 4                  | $45,55 \pm 17,95$         | $55,30 \pm 13,73$     | 0,66      |
| 66:66              | 4                  | $52,67 \pm 19,24$         | $44,04 \pm 17,2$      | 1,09      |
| 100:100            | 4                  | $58,58 \pm 27,17$         | $50,39 \pm 14,93$     | 0,82      |

Come mostrato in Figg. 3.20 e 3.21, sia nel 2011 che nel 2012 la percentuale di uova schiuse è stata sempre più alta nei tunnel di controllo che in quelli con maschi irraggiati.

L' IC, a tutte le densità di maschi testate (Fig. 3.22), non ha invece mostrato differenze significative né nel 2011 ( $F=3,29$ ;  $p=0,14$ ) né nel 2012 ( $F=1,121$ ;  $p=0,378$ ).

Si è visto però che, quando il rapporto di competizione fertili:sterili è 33:33, i maschi fertili sono più competitivi rispetto a quelli sterili. Quando il rapporto è 66:66 o 100:100 i maschi sterili e fertili si equivalgono.

Nelle diverse prove condotte nel 2012 si è avuta una forte differenza nel numero di femmine che hanno effettuato il pasto di sangue. Si è provato quindi a dividere i dati non in funzione del numero di maschi sterili o fertili ma in funzione del rapporto tra i maschi sterili o fertili lanciati (33, 66, 100) e le femmine che hanno effettuato il pasto di sangue. Sono state individuate tre categorie  $M:F < 1$ ,  $1 < M:F < 2$  e  $M:F > 2$ .

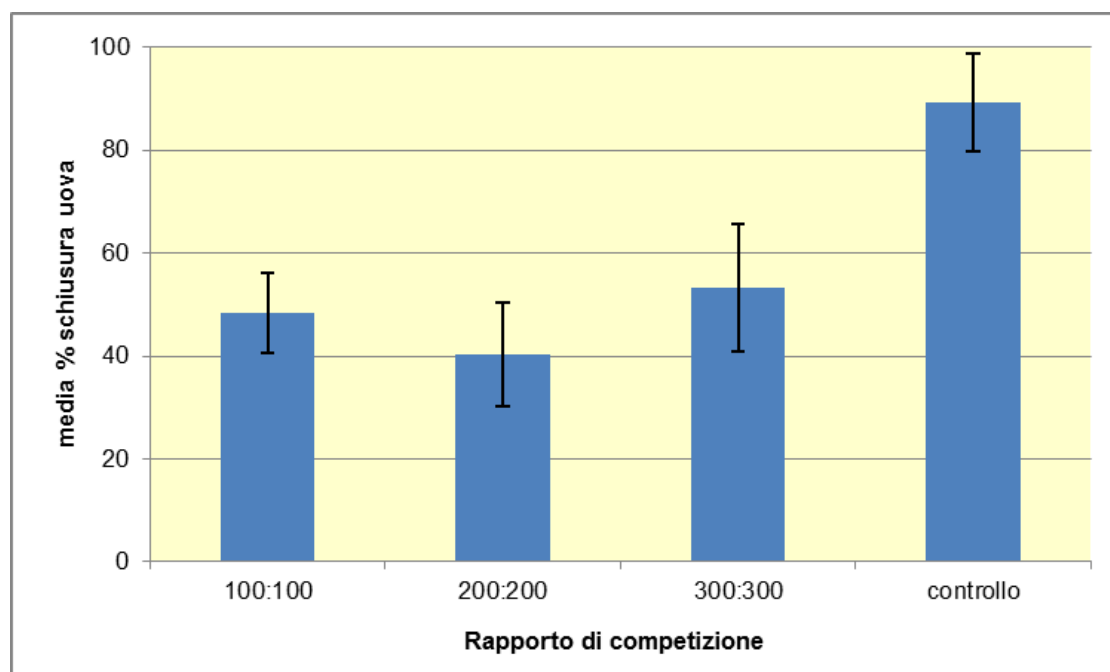


Fig. 3.20 - Percentuale schiusura uova nei tunnel di competizione e nei tunnel di controllo (anno 2011)

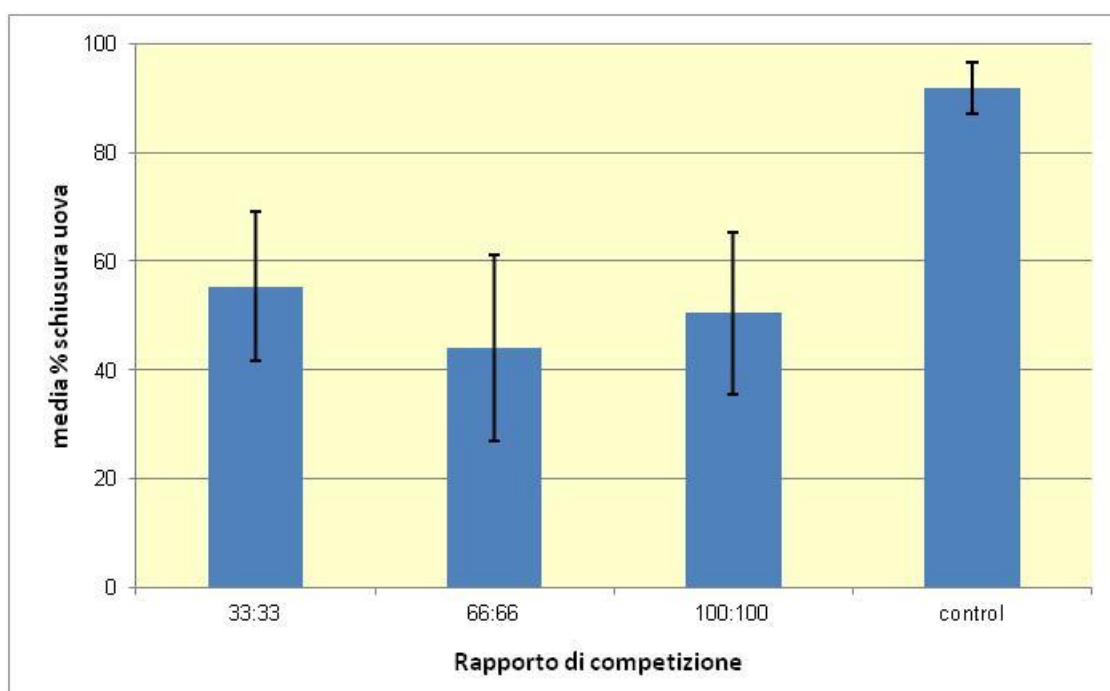


Fig. 3.21 - Percentuale schiusura uova nei tunnel di competizione e nei tunnel di controllo (anno 2012)

L'analisi del coefficiente di competizione IC evidenzia una bassa variabilità quando  $M:F < 1$  e una scarsa competizione dei maschi sterili. Viceversa, con l'aumentare del rapporto tra  $M:F$  si osserva un aumento della competitività dei maschi sterili che diventano più competitivi dei maschi fertili ed un incremento della variabilità (Tab. 3.9). Anche in questo caso, comunque, il test Anova non ha evidenziato differenze significative ( $F=1,649$ ;  $p=0,259$ ).

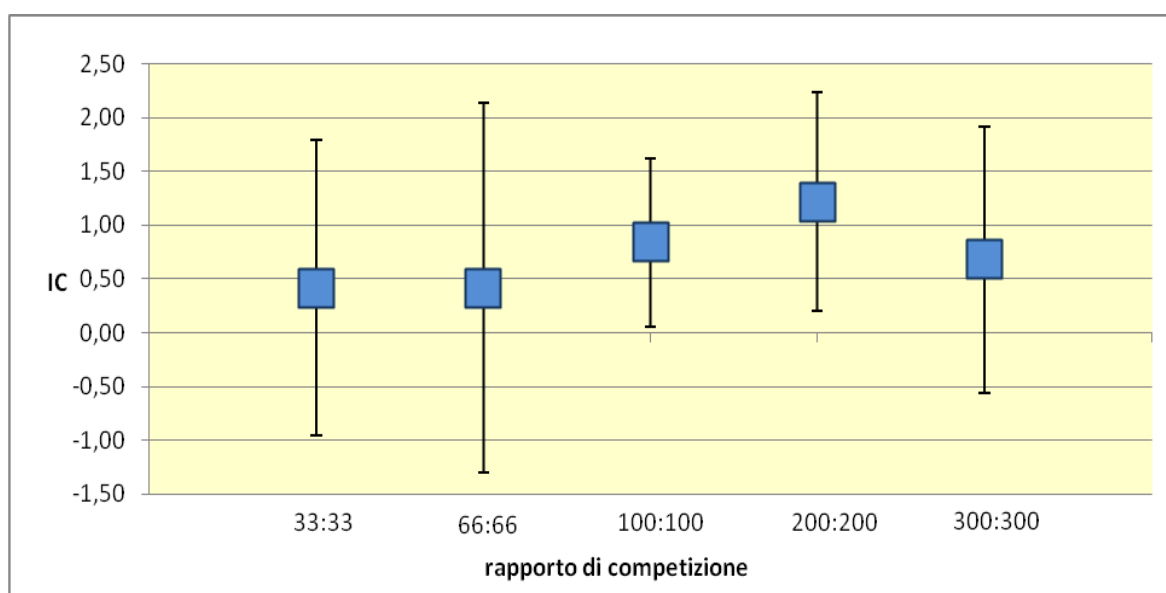


Fig. 3.22 - Indice di competizione registrato nelle prove 2011-2012

Tab. 3.9 - IC in funzione del rapporto tra i maschi sterili o fertili lanciati e femmine che hanno effettuato il pasto di sangue

| <i>Rapporto</i>      | <i>N</i>  | <i>Mean</i> | <i>SD</i>   | <i>Variance</i> |
|----------------------|-----------|-------------|-------------|-----------------|
| <i>Machi/Femmine</i> |           |             |             |                 |
| <i>M:F&lt;1</i>      | <i>2</i>  | <i>0,37</i> | <i>0,07</i> | <i>0,00</i>     |
| <i>1&lt;M:F&gt;2</i> | <i>3</i>  | <i>1,02</i> | <i>0,47</i> | <i>0,22</i>     |
| <i>M:F&gt;2</i>      | <i>5</i>  | <i>1,11</i> | <i>0,56</i> | <i>0,32</i>     |
| <i>Tutti</i>         | <i>10</i> | <i>0,93</i> | <i>0,53</i> | <i>0,28</i>     |

Per valutare se esistono differenze tra i quattro tunnel dovute alla loro posizione sul campo, sono stati analizzati, per ogni tunnel: il numero di femmine che hanno effettuato il pasto, l'indice di competizione e la percentuale di sopravvivenza di maschi e femmine dopo 12 giorni in tutti i tunnel.

Per nessuno di questi parametri sono state riscontrate differenze significative anche se la sopravvivenza di maschi e femmine è risultata decisamente più bassa nel tunnel 4 (Fig. 3.23).

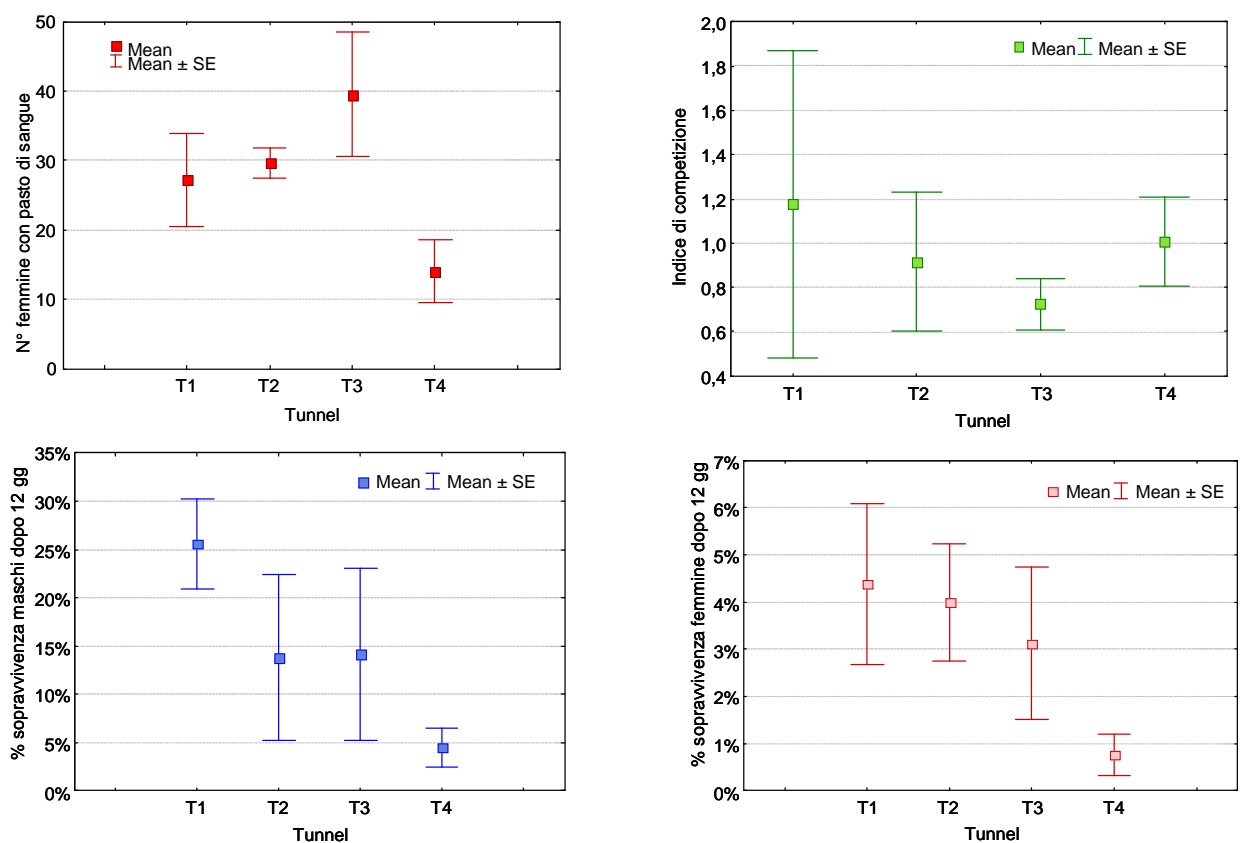


Fig. 3.23 - N° di femmine con pasto, indice di competizione e percentuale di sopravvivenza di maschi e femmine nei 4 tunnel

## 4. Discussione e conclusioni

Obiettivo di questa ricerca è stato quello di valutare, mediante studi di laboratorio, di semicampo e di campo, il livello di competitività dei maschi allevati nei confronti dei maschi selvatici.

Esperimenti di marcatura, rilascio e ricattura sono stati effettuati per misurare la sopravvivenza e la dispersione in campo di maschi allevati e sottoposti a irraggiamento.

Gli studi di questo tipo sui maschi di zanzara sono pochi quindi i dati ottenuti sono difficilmente confrontabili con altri. Niebylski e Craig (1994) hanno osservato che la massima distanza percorsa dai maschi di *Ae. albopictus* marcati con polveri fluorescenti era di 225m. Takagi (1995), in uno studio condotto nel campus dell'Università di Nagasaki, in Giappone, sempre con maschi marcati con polveri fluorescenti, ha trovato che la massima distanza di spostamento era inferiore a 36m dal sito di rilascio. Lacroix et al. (2007), in uno studio sulla dispersione dei maschi di *Ae. albopictus* a La Réunion ha ottenuto valori di MDT variabili tra 29 e 46m, riferiti a un raggio di ricattura di max 130m. In studi precedenti condotti dal Centro Agricoltura Ambiente (Bellini et al., 2010), si è visto che i maschi, marcati con due diversi metodi (polveri fluorescenti e rimozione di *Wolbachia*) e non irraggiati, erano in grado di disperdersi, in 7 giorni, fino a 200-300 m.

Nel primo studio condotto nell'ambito del progetto di dottorato, invece, i maschi irraggiati a 30 Gy sono stati ricatturati fino a 350m dal punto di rilascio. Nell'ottica di un programma di lanci di maschi sterili in campo, questo dato ci può dare un'indicazione della distanza da tenere tra i diversi siti di rilascio: un raggio di circa 300-400 m potrebbe essere ottimale per coprire l'intera area da controllare.

Il sistema di marcatura adottato (rimozione di *Wolbachia*) non sembra influenzare o inibire la capacità di dispersione degli individui lanciati. Il principale aspetto positivo di tale sistema di marcatura risiede nella completa assenza di manipolazione dei maschi adulti da lanciare. Infatti, la rimozione del batterio *Wolbachia* e quindi la marcatura, avviene sui livelli parentali e il rilascio è effettuato allo stadio di pupa evitando il trasporto degli adulti, piuttosto delicati. Altrettanto efficace si è dimostrata la sterilizzazione, in quanto pare che il dosaggio di 30 Gy abbia un impatto limitato sulla fitness dei maschi liberati.



Nella seconda prova di dispersione, la densità dei maschi in campo è stata misurata in modo indiretto prendendo in considerazione il rapporto tra maschi sterili e maschi selvatici. I dati di sopravvivenza ricavati davano quindi indicazione non tanto della sopravvivenza assoluta ma della variazione nel tempo del rapporto tra maschi sterili e maschi selvatici. L'utilizzo nelle prove di due tipi diversi di dieta larvale non ha però permesso di confrontare tra loro i dati ottenuti. Nei lanci effettuati si è vista una sopravvivenza dei maschi maggiore quando l'umidità relativa e le precipitazioni avvenute nel periodo precedente ai lanci sono state maggiori, e al contrario una minore longevità dei maschi quando il periodo precedente ai lanci è stato più secco.

Ciò significa che la bassa umidità relativa, le alte temperature e le intense radiazioni solari possono influenzare negativamente la distanza percorsa dai maschi e ridurre l'omogeneità di dispersione.

Visti i risultati ottenuti sono state effettuate numerose prove, in laboratorio e in semicampo, per arrivare a realizzare un supporto energetico da inserire nelle stazioni di lancio in campo al fine di aumentare la longevità dei maschi sterili e fornire loro un'energia immediata per la dispersione.

I test effettuati in campo hanno dimostrato che la fonte alimentare influisce in modo diverso a seconda delle condizioni climatiche. Quando l'RH è intorno al 40% i maschi alimentati con zucchero nelle aree di lancio con fonte alimentare sono risultati oltre 4 volte in più rispetto al testimone, mentre con valori di RH alti la fonte alimentare sembra influire meno, probabilmente per la presenza di fonti alimentari naturali sufficienti.

Anche per quanto riguarda la temperatura, quando la media giornaliera è intorno a 29°C i maschi alimentati sono risultati oltre 4 volte di più in presenza di supporto alimentare.

In primavera, quindi, la fonte alimentare supplementare probabilmente si rivela inutile, in quanto in natura i maschi riescono a reperire altre fonti alimentari; in estate, invece, può essere un aiuto importante.

Il supporto energetico è stato testato anche in tunnel, mettendo in competizione maschi fertili e sterili con e senza supporto. In tutte le prove condotte si è visto che lo zucchero influisce in modo positivo sui maschi che se ne nutrono, sia fertili che sterili, fornendogli un supporto nella competizione.

Per verificare se la pressione selettiva dovuta all'allevamento in gabbia e gli eventuali danni subiti dai maschi a seguito dell'irraggiamento possono influenzare l'esito di un programma SIT, è necessario testare condizioni sperimentali il più possibile vicino a quelle di campo. Per questo, da alcuni anni, il Centro Agricoltura Ambiente conduce prove in tunnel costruiti in pieno campo (Bellini et al. 2013) in un parco privato ad Anzola Emilia.

Non esistono però linee guida che indichino quali siano le dimensioni da utilizzare e il numero di maschi da mettere in competizione. Le prove condotte utilizzando maschi allevati e maschi selvatici, oppure ceppi ibridi, hanno sempre dato esiti positivi riguardo la competizione tra maschi sterili e fertili. I risultati ottenuti, però, hanno sempre mostrato una grande variabilità.

Per validare l'utilizzo di questo mezzo di studio, sono quindi state testate diverse densità di maschi fertili e sterili in competizione per lo stesso numero di femmine all'interno di tunnel di dimensioni 8m x 5m x 2,8m. I maschi sono stati irraggiati a 30 Gy e le femmine sono state inserite nei tunnel a distanza di 3 giorni dall'immissione dei maschi. In prove condotte nel 2006 si è visto, infatti, che i maschi irraggiati erano avvantaggiati nella competizione con i fertili perché le radiazioni inducono una precocità nella maturazione sessuale, fenomeno notato anche da Curtis per *Glossina* (Curtis, 1970).

Le diverse combinazioni testate per verificare se la ratio tra maschi e femmine può influenzare i risultati di competitività, non hanno mostrato differenze tra una tesi e l'altra, rimanendo irrisolto il problema della elevata variabilità.

I risultati ottenuti mettendo a confronto maschi fertili e maschi sterili, sia nelle prove di dispersione che nelle prove in tunnel, hanno inoltre dimostrato che l'irraggiamento a 30 Gy non sembra influenzare negativamente la fitness dei maschi sterili. Questi, infatti, sono in grado di spostarsi sul territorio quanto i maschi fertili e dimostrano una capacità di accoppiamento con le femmine solo lievemente inferiore a quella dei maschi fertili.

## 5. Bibliografia

Alphey L. 2007. Engineering insects for the sterile insect technique. In: Vreysen, M, Robinson, A, Hendrichs, J, eds. Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2007:51-60.

Alphey L. & Andreasen M. 2002. Dominant lethality and insect population control. Molecular and Biochemical Parasitology 121, 173-178.

Asman K. N. F., Reisen S. M. 1987. Changes in the biology of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) associated with colonization under contrasting regimes. Environ. Entomol. 16(2): 405-14

Balestrino F. 2008. Sviluppo della lotta autocida contro *Aedes albopictus* (Skuse) (DIPTERA: CULICIDAE). Tesi di Dottorato Entomologia Agraria, DiSTA - Università degli Studi di Bologna.

Balestrino F., Medici A., Candini G., Carrieri M., Maccagnani B., Calvitti M., Maini S., Bellini R. 2010. Gamma ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. J. Med. Entomol. 47(4): 581-591; DOI: 10.1603/ME09272.

Barry, J. D., Blessinger T. and Morse J. G. 2004. Recapture of sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in California's preventative release programme. J. Econ. Entomol. 97: 1554-1562.

Baumhover A. H., Grahln A. J., Bitter B. A., Hopkins D. E., New W. D., Dudley F. H., and Bushland R. C. 1955. Screw-worm control through release of sterilized flies. J. Econ. Entomol. 48: 462- 466.

Bellini R. 2005. Applicazione della tecnica del maschio sterile nella lotta ad *Aedes albopictus*. Tesi di Dottorato Entomologia Agraria, DiSTA - Università degli Studi di Bologna, 82 pagg.

Bellini R., Albieri A., Balestrino F., Carrieri M., Porretta D., Urbanelli S., Calvitti M., Moretti R. and Maini S. 2010. Dispersal and survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) males in urban areas and significance for sterile Insect Technique Application. J. Med. Entomol. 47(6): 1082-1091.

Bellini R., Balestrino F., Medici A., Gentile G., Veronesi R., Carrieri M.. 2013. Mating competitiveness of *Aedes albopictus* radio-sterilized males in large enclosures exposed to natural conditions. J. Med. Entomol. 50 (1): 94-102. doi: <http://dx.doi.org/10.1603/ME11058>.

Bellini R., Calvitti M., Medici A., Carrieri M., Celli G. and Maini S. 2007. Use of the Sterile Insect Technique Against *Aedes albopictus* in Italy: First Results of a Pilot Trial. In: Area-Wide Control of Insect Pests (Vreysen, MB, Robinson, AS and Hendrichs, J, eds.). pp. 505-515. Springer Netherlands, Dordrecht.

Bellini R., Carrieri M., Bacchi M. 1996. Optimization of *Aedes albopictus* surveillance and control activities in northern Italy. 10<sup>th</sup> Ann. Meet. Soc. Vector Ecol. Europ. Reg. A.E.D.E.S., Strasbourg, France, 2-6 September: 88-89.

Bellini R., Carrieri M., Bacchi M., Fonti P. and Celli G. 1998. Possible utilization of metallic copper to inhibit *Aedes albopictus* (Skuse) larval development. Journal of the American Mosquito Control Association 14(4): 451-456.

Benedict M. Q., Levine R. S., Hawley W. A. and Lounibos P. 2007. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. Vec. Borne Zoon. Dis. 7: 76-85.

Benedict M. Q and Robinson A. S. 2003. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. TRENDS in Parasitology Vo1.19 No.8 August 2003.

Brelsfoard C., Sechan Y., Dobson S. 2008. Interspecific hybridization yields strategy for South Pacific filariasis vector elimination. PLoS. Negl. Trop. Dis. 2008; 2: e129.

Briegel, H., Knusel I. and Timmermann S. E. 2001. *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. J. Vector Ecol. 26: 21-31.

Bushland R.C., Hopkins D.E. 1953. Sterilization of screwworm flies with X-rays and gamma rays. J. Econ. Entomol. 48: 648-656

Calvitti M., Moretti R., Lampazzi E., Bellini R. and Dobson S. 2010. Characterization of a New *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)–*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Symbiotic Association Generated by Artificial Transfer of the wPip Strain From *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 47(2): 179-187

Cancrini G., Raineri V. and Della Torre A. 1992. *Aedes albopictus* quale possibile vettore di dirofilariosi canina ed umana in Italia. Parassitologia. 34 (1):13.

Carrieri M., Bellini R., Maccaferri S., Gallo L., Maini S. and Celli G. 2008. Tolerance threshold for *Aedes albopictus* and *Aedes caspius* in Italian urban areas. J. Am. Mosq. Contro Assoc. 24: 377-386.

Carter S.W.. 1989. A review of the use of synthetic pyrethroids in public health and vector pest control. Pestic. Sci. 27: 361-374

Coppel H. C., Merlins J. W. 1977. Biological insect pest suppression. Springer-Verlag, New York.

Craig G.B. Jr. 1964. Applications of genetic technology to mosquito rearing. Bull. World Health Organ. 31: 469-473.

Colonna R., Lifrieri L., Carrieri M., Veronesi R. and Bellini R. 2004. Evaluation of SUMILARV® 0,5G performances against mosquitoes in catch basin in Northern Italy. 3rd Workshop Europ. Mosq. Control Assoc., Osijek, Croatia, October 6-9, pag. 24-25.

Curtis C. F. 1970. The stimulation of emergence from *Glossina* pupae with gamma rays. Acta Trop. 27: 89-93.

Dalla Pozza G.L., Romi R., Severini C. 1994. Source and spread of *Aedes albopictus* in the Veneto Region of Italy. J. Am. Mosq. Assoc. 10(4): 589-592

Hawley W. A. 1988. The biology of *Aedes albopictus*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 4: 1-40.

Dame D. A., Logfren C. S., Ford H. R., Boston M. D., Baldwin K. F. and Jeffery G. M. 1974. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. II. Methods of rearing, Sterilization, and Distribution. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 23: 282-287.

Bobson S. L., Rattanadechakul W. and Marsland E. J. 2004. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single and superinfected *Aedes albopictus*. Heredity, 93: 135-142.

Flacio, E., Lüthy P., Patocchi N., Guidotti F., and Peduzzi R. 2004. Control strategy of *Aedes albopictus* in Switzerland, p. 13. In Proceedings: 3rd European Mosquito Control Association Workshop, 6-9 October 2004, Osijek, Croatia. University of Josip Jurai Strossmayer, Osijek, Croatia.

Flath R.A., Cunningham R.T., Mon T.R., John J.O. 1994. Male lures for Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied.: structural analogues of -copaene. J. Chem. Ecol. 20: 2595-2609

Foster, W.A. 1995. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. Annu. Rev. Entomol. 40: 443-474.

Gary R.E. Jr. and Foster W.A. 2004. Diel timing and frequency of sugar feeding in the mosquito *Anopheles gambiae*, depending on sex, gonotrophic state and resource availability. Med. Vet. Entomol. 20: 308-316.

Hendrichs J., Franz G., Rendon P. 1995. Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting season. J. Appl. Entomol. 119: 371-377

Howell P., Knols B. G. J. 2009. Male mating biology. Malar. J. 8 (Suppl 2) :S8.

Impoinvil D. E., Kongere J. O., Foster W. A., Njiru B. N., Killeen G. F., Githure J. I., Beier J. C., Hassanali A., Knols B. G. J. 2004. Feeding and survival of the malaria vector *Anopheles gambiae* on plants growing in Kenya. Medical and Veterinary Entomology ; 18, 108-115.

Klassen W, Curtis CF. 2005. History of the sterile insect technique. In Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Edited by Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005 :3-38.

Knipling EF, Laven H, Craig GB, Pal R, Smith CN, Brown AWA: Genetic control of insects of public health importance. Bull World Health Organ 1968, 38:421-438.

Knipling E.F. 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. J. Econ. Entomol. 8:459-469

Lacroix R., Delatte H., Hue T. and Reiter P. 2007. Dispersion des males *Aedes albopictus* en milieu peri-urbain a` la Reunion. Bull. Soc. Pathol. Exot. 100 (5): 325.

Lilie T.H., Marquardt W.C., Jones R.H. 1981. The flight range of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). Can. Ent. 113: 419-426.

Marchand R. P. 1985. A new cage for observing mating behavior of wild *Anopheles gambiae* in the laboratory. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1:234-236.

Medici A., Carrieri M., Scholte E-J., Bellini R. 2000. Studies aimed to set-up a sterilization technique program against *Aedes albopictus* Skuse. 13th Ann. Meet. Soc. Vector Ecol., Europ. Reg., Belek, Turkey, Sept. 24-29.

Mitchell C. J. 1995. Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the mediterranean basin. J. Vector Ecol. 20: 44–58.

Mori A. 1979. Effects of larval density and nutrition on some attributes of immature and adult *Aedes albopictus*. Trop. Med. 21: 85-103.

Morris C. D., Larson V. L., Lounibus L. P. 1991. Measuring mosquito dispersal for control programs. Journal of the American Mosquito Control Association. Vol. 7 n°4.

Nayar, J. K. 1968. The biology of *Culex nigripalpus* Theobald (Diptera: Culicidae). Part 2. Adult characteristic at emergence and adult survival without nourishment. J. Med. Entomol. 5: 203-10.

Nayar, J. K. 1969. Effects of larval and pupal environmental factors on biological status of adults at emergence in *Aedes taeniorhynchus* (Wiedermann). Bull. Entomol. Res. 58: 811-27.

Nayar J.K. and Sauerman D.M. Jr. 1975. The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida mosquitoes. Part 1. Utilization of sugar for survival. J. Med. Entomol. 12: 92-98.

Nayar, J.K. and P. A. Pierce, 1977. Utilization of energy reserve during survival after emergence in Florida mosquitoes. J. Med. Entomol. Vol. 14, n° 1: 54-59.

Niebylski M. L. and Craig G. Jr. 1994. Dispersal and survival of *Aedes albopictus* at a scrap tire yard in Missouri. J. Am. Mosq. Control Assoc. 10: 339-343.

Petric D., Pajovic A., Cupina A., Konjevic A., and Zgomba M. 2003. Possible establishment of *Aedes albopictus* (Skuse 1894) in Serbia and Montenegro, p. 85. In Proceedings: 14th



European Conference of the Society of Vector Ecology, 3-6 September 2003, Bellinzona, Switzerland. Istituto Cantonale di Microbiologia, Bellinzona, Switzerland.

Phuc H. K., Andreassen M. H., Burton R. S., Vas C. et al. 2007. Lateacting dominant lethal genetic systems and mosquito control. BMC Biol 2007; 5:11.

Reisen W. K., Sakai R. k., Baker R. H., Rathor H. R., Raana K. and Niaz S. 1980 Field competitiveness of *Culex tritaeniorhynchus* Giles males carrying a complex chromosomal aberration: a second experiment. Annals of the Entomological Society of America, 73: 479-484.

Reisen W. K., Asman S. M., Milby M. M., Bock M. E., Stoddard P. E., Meyer R. P. and Reeves V. C. 1981. Attempted suppression of semi-isolated population of *Culex tarsalis* by release of irradiated males. Mosquito News 41: 736-744.

Reisen W. K., Milby M. M., Asman S. M., Bock M. E., Meyer R. P., McDonald P. T. and Reeves V. C.. 1982. Attempted suppression of semi-isolated *Culex tarsalis* population by the release of irradiated males: a second experiment using males from a recent colonized strain. Mosquito News 42: 565-575.

Reisen W. K., Knop N. F. and Peloquin J. J. 1985. Swarming and mating behaviour of laboratory and field strain of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). Annals of the Entomological Society of America, 78: 667-673.

Reiter P., Sprengen D. 1987. The used tire trade: a mechanism for the world-wide dispersal of container breeding mosquitoes. Mosq. News 44(3): 385-395.

Robinson A.S. 2002. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitidis capitata*, sterile insect technique programmes. Genetica 116: 5-13

Robinson A. S., , Knols B., Voigt G., Hendrichs J. 2009. Malaria Journal 2009, 8 (Suppl 2): S1 (16 November 2009).

Sabattini A., Raineri V., Trovato G., Coluzzi M.. 1990. *Aedes albopictus* in Italia e possibile diffusione della specie nell'area mediterranea. *Parassitologia* 32: 301-304

Sharma V.P. 1985. Integrated Mosquito Control Methodologies, Vol. 2, Academic Press London, Chapt. 5.

Schaffner, F. and Karch S. 1999. *Aedes albopictus* discovered in France. *SOVE Newsletter* 30: 11.

Schaffner, F., Bortel W. V. and Coosemans M. 2004. First record of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in Belgium. *Journal of the American Mosquito Control Association* 20: 201-204.

Shelly T.E., Mcinnis D.O., Pahio E., Edu J. 2004. Aromatherapy in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): sterile males exposed to ginger root oil in pre-release storage boxes display increased mating competitiveness in field-cage trials. *J. Econ. Entomol.* 97: 846-853

Shroyer, D. A. 1986. *Aedes albopictus* and arboviruses: a concise review of the literature. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2(4): 424–428.

Takagi M., Tsuda Y. and Wada Y. 1995. Temporal and spatial distribution of released *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Nagasaki, Japan. *Jpn. J. Sanit. Zool.* 46: 223-228.

Taylor R. M., Pfannenstiel R. S. 2009. How Dietary Plant Nectar Affects the Survival, Growth, and Fecundity of a Cursorial Spider *Cheiracanthium inclusum* (Araneae: Miturgidae). *Environmental Entomology*: Vol. 38, 1379-1386.

Thomas D. D., Donnelly C. A. , Wood R. J., Alphey L. S. 2000. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* 287:2474-2476.

Urbanelli S., R. Bellini, M. Carrieri, P. Sallicandro, and G. Celli. 2000. Population structure of *Aedes albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. *Heredity* 84: 331-337.

Van Handel E. 1965. The obese mosquito. *J. Physiol.* 181: 478-86.

Vazeille-Falcoz M., Adhami J., Mousson L., Rodhain F.. 1999. *Aedes albopictus* from Albania: a potential vector of dengue viruses. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15 (4): 475-478

Vreysen M.J.B., Saleh K. M., Ali M. Y., Abdulla A. M., Zhu Z.-R., Juma K. G., Dyck V. A., Msangi A. R., Mkonyi P. A., and Feldmann H. U. 2000. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *J. Econ. Entomol.* 93: 123-135.

Waldemar Klassen,. 2009. *Malaria Journal* 2009, 8 (Suppl 2):1 (16 November 2009)

Weidhaas D. E., Schmidt C. H. and Seabrook E. L. 1962. Field studies on the release of sterile males for the control of *Anopheles quadrimaculatus*. *Mosquito News*, 22: 283-290.

White D. J. and Morris C. D. 1985. Bionomics of anthropophilic Simuliidae (Diptera) from the Adirondack Mountains of New York State, USA. *Journal of Medical Entomology* 22: 190-199

Whitten M. J. and Foster G. G. 1975. Genetical methods of pest control. *Annu. Rev. Entomol.* 20: 461-476.

Wyss J. H. 2000. Screw-worm eradication in the Americas. *Ann. NY Acad. Sci.* 916: 186-193.

Zalom F. G., Asman S. M. and Meyer R. P. 1981. Mating competitiveness of irradiated males of *Culex tarsalis* in a field cage study. *Mosquito News*, 41: 230-232.

Zhou G., Pennington J.E. and Wells M.A. 2004a. Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. Insect Biochem. Mol. Biol. 34: 919-925.

Zhou G., Scaraffia P.Y. and Wells M.A. 2004b. Vector nutrition and energy metabolism. In: J.B. Beaty and W.C. Marquardt (eds.). The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado, Colorado.